

Universidade Brasil – Campus Itaquera
Instituto Científico e Tecnológico da Universidade Brasil
Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica

***Efeito do selante de fibrina heterólogo associado ao exercício
aquático no processo de reparo tendíneo em ratas***

SILVIA MARIA CARDOSO MAGALHÃES HIDD

Orientador: Prof. Dr. Marcello Magri Amaral

Coorientadora: Prof.^a Dra. Carla Roberta Tim

São Paulo, SP

2020

Effect of heterologous fibrin sealant associated with aquatic exercise on the tendon repair process in rats

SILVIA MARIA CARDOSO MAGALHÃES HIDD

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil, como parte dos requisitos necessários para obtenção do título de Mestre em Engenharia Biomédica.

Área de Concentração: Engenharia Biomédica

Orientador: Marcello Magri Amaral

Coorientadora: Carla Roberta Tim

São Paulo, SP

2020

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Bibliotecas da Universidade Brasil, com os dados fornecidos pelo (a) autor (a).

M169e HIDD, Silvia Maria Cardoso Magalhães
Efeito do selante de fibrina heterólogo associado ao exercício aquático no processo de reparo tendíneo em ratas / Silvia Maria Cardoso Magalhães Hidd -- São Paulo, 2020.
67 f.: il.

Dissertação de Mestrado defendida no Programa de Pós-graduação do Curso de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil.

Orientação: Prof. Dr. Marcello Magri Amaral.

Coorientação: Profa. Dra. Carla Roberta Tim.

1. Selante de Fibrina Derivado do Veneno de Serpente. 2. Ruptura do Tendão Calcâneo. 3. Exercício Aquático. I. AMARAL, Marcello Magri. II. TIM, Carla Roberta. III. Título.

CDD 620.82



TERMO DE APROVAÇÃO

SILVIA MARIA CARDOSO MAGALHÃES HIDD

**“EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA HETERÓLOGO ASSOCIADO AO EXERCÍCIO
AQUÁTICO NO PROCESSO DE REPARO TENDÍNEO EM RATAS”**

Dissertação aprovada como requisito parcial para obtenção do título de **Mestre no Programa de Pós-Graduação em Engenharia Biomédica** da Universidade Brasil, pela seguinte banca examinadora:

Prof.(a). Dr.(a) Marcelo Magri Amaral (presidente-orientador)

Prof.(a). Dr.(a) Livia Assis Garcia (UNIVERSIDADE BRASIL)

Prof(a). Dr(a) Cintia Cristina Santi Martignago (Centro Universitário UNIFAAT)

São Paulo, 10 de junho de 2020

Presidente da Banca Prof(a). Dr(a) Marcelo Magri Amaral

Houve alteração do Título: sim () não (X):

FOLHA DE AUTORIZAÇÃO PARA PUBLICAÇÃO DO TEXTO NA PÁGINA
UNIVERSIDADE BRASIL E BANCO DE TESES CAPES E REPRODUÇÃO DO
TRABALHO



Termo de Autorização

Para Publicação de Dissertações e Teses no Formato Eletrônico na Página WWW do Respeetivo Programa da Universidade Brasil e no Banco de Teses da CAPES

Na qualidade de titular(es) dos direitos de autor da publicação, e de acordo com a Portaria CAPES no. 13, de 15 de fevereiro de 2006, autorizo(amos) a Universidade Brasil a disponibilizar através do site <http://www.universidadebrasil.edu.br>, na página do respectivo Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*, bem como no Banco de Dissertações e Teses da CAPES, através do site <http://bancodeteses.capes.gov.br>, a versão digital do texto integral da Dissertação/Tese abaixo citada, para fins de leitura, impressão e/ou *download*, a título de divulgação da produção científica brasileira.

A utilização do conteúdo deste texto, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, fica condicionada à citação da fonte.

Título do Trabalho: **“EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA HETERÓLOGO ASSOCIADO AO EXERCÍCIO AQUÁTICO NO PROCESSO DE REPARO TENDÍNEO EM RATAS”**

Houve alteração do Título: sim () não ()

Autor(es):

Discente: **Silvia Maria Cardoso Magalhães Hidd**

Assinatura: *Silvia Maria Cardoso Magalhães Hidd*

Orientador(a): **Prof. Dr. Marcello Magri Amaral**

Assinatura: *Marcello Magri Amaral*

Coorientador(a): Profª. Drª. Carla Roberta Tim

Assinatura: *Carla Roberta Tim*

Data: 10/06/2020

AGRADECIMENTOS

À Deus, por ter me guiado com retidão e não permitir que eu sucumbisse perante as dificuldades. Aos meus pais, Moacir Silva Magalhães e Maria da Conceição Cardoso Magalhães e meus irmãos e sobrinhos pelas orações e pensamentos positivos enviados, mantendo-me perseverante sempre. Ao meu esposo Marcelo Tajra Hidd por conseguir transformar meu abuso em alegria e me confortar nos momentos de angústia e ansiedade. Aos meus filhos Aziz Marcelo Hidd e Thomaz Marcelo Hidd pelos períodos ausentes de atenção.

Obrigada meus professores – orientador Dr. Marcello Magri Amaral e coorientadora Dr.^a Carla Tim, pelos ensinamentos preciosos compartilhados durante a execução deste projeto, pelo exemplo de profissional, pela paciência, dedicação e apoio durante todos os momentos.

Ao Departamento de Engenharia Biomédica da Universidade Brasil. Ao Departamento do Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia e Biodiversidade da Universidade Estadual do Piauí, na pessoa do prof. Antônio Luiz M. Maia Filho e prof. Dr. José Figueredo Silva e aos demais colaboradores do biotério, por fornecer os animais e pela paciência e disposição, auxiliando com a pesquisa e pela amizade construída. Ao Centro de Estudo de Venenos e Animais Peçonhentos. À Faculdade de Medicina de Botucatu. Ao amigo Enéas Dutra Júnior, pelos ensinamentos, paciência e comprometimento com a pesquisa, pela prontidão e exemplo de pessoa. Aos meus colegas de mestrado, na pessoa de Conceição Carvalho, pelo apoio e incentivo nessa jornada.

Agradeço a todos pela torcida, incentivo, amizade e confiança.

“A persistência é o caminho do êxito”
Charles Chaplin

RESUMO

A ruptura aguda do tendão calcâneo é um tipo lesão muito comum, seu crescente acometimento está geralmente relacionado à prática esportiva. Seu tratamento é um tema bastante controverso, que envolve diversos métodos, conservadores e cirúrgicos. Estas técnicas podem desencadear problemas que impossibilitam sua reparação completa. Atualmente, diversos estudos vêm sendo realizados buscando novas terapias para proporcionar uma rápida reparação tecidual, de baixo custo e que reduza os efeitos negativos sobre as condições de saúde da população. Dentre as diversas abordagens, os biomateriais têm apresentado uma excelente alternativa para o processo de reparação. O selante fibrina derivado do veneno de serpente (SFDVS) é um biopolímero que vem sendo utilizado com sucesso em diferentes métodos cirúrgicos, tanto em modelo animais quanto em seres humanos, devido seu potencial hemostático e adesivante. Dentre as estratégias terapêuticas para a reabilitação, destaca-se o exercício aquático, que consiste em exercícios físicos voltados à melhora das propriedades musculares, auxiliando a redução de dores e edemas, estimulando o processo de reparo. Assim, o presente trabalho teve o objetivo de avaliar o uso do SFDVS associado, ou não, ao exercício aquático como forma de tratamento no processo de reparo do tendão calcâneo de ratas. Para isso, 84 ratas da linhagem Wistar passaram por indução cirúrgica de transecção parcial do tendão calcâneo. Os animais foram aleatoriamente divididos em quatro grupos de tratamento e subdivididos em três períodos (7, 14 e 21 dias) contendo 7 animais em cada: Controle (L); SFDVS (LS); exercício aquático (LE); SFDVS associado ao exercício aquático (LSE). O volume do edema foi avaliado 24 h, 7, 14 e 21 dias após o procedimento cirúrgico. Cortes histológicos do tendão calcâneo foram avaliadas para quantificação do colágeno (por Tricrômico de Masson e Picrosirius Red) e as alterações patológicas pela análise de lâminas coradas com HE. O escore de Bonar, foi utilizado para avaliar a morfologia celular, a celularidade, a vascularização e o acúmulo de substância fundamental. A comparação entre os grupos experimentais foi realizada utilizando-se testes de Kruskal-Wallis e ANOVA, com nível de significância de 0,05. Foi observada uma maior redução do edema dos animais a partir do sétimo dia em todos os tratamentos ($p < 0,002$), quando comparado ao grupo controle. Após 7 e 14 dias de tratamento, o LE apresentou a maior redução do volume de edema ($p = 0,03041$) comparada ao controle. Após 21 dias de tratamento (LS) foi o que apresentou a maior redução do edema comparado ao grupo controle. Mediante a quantificação do colágeno foi possível verificar um aumento de sua concentração para o LSE no período avaliado após de 21 dias de tratamento. A análise histopatológica utilizando escore de Bonar demonstrou uma melhora significativa das características histopatológicas nos tendões de animais tratados com (LSE21), apresentando valores de escore estatisticamente menores quando comparado aos demais grupos. Desta forma, o SFDVS associado ao exercício aquático influenciou de forma positiva a reparação do tendão calcâneo, se tornando um tratamento promissor para futuras aplicações clínicas.

Palavras-chave: Selante Fibrina Derivado do Veneno de Serpente, Ruptura do Tendão Calcâneo, Exercício aquático.

ABSTRACT

Acute rupture of the calcaneus tendon is a very common type of injury, its increasing is generally related to sports practices. Its treatment is a controversial topic, involving several methods, conservative and surgical. These techniques can trigger problems that harms their complete regeneration. Currently, several studies have been carried out looking for new therapies to provide a low-cost fast tissue repair and reduced negative effects on population health conditions. Among different approaches, biomaterials have presented an excellent alternative for this regeneration process. Fibrin sealant derived from snake venom (SFDVS) has been used successfully in different surgical methods, both in animal's and humans' models, due to its hemostatic and adhesive potential. Aquatic exercise is one of the therapeutic strategies for rehabilitation, it consists of physical exercises to improve muscle properties, helping to reduce pain and edema, stimulating the repair process. Thus, the present study aimed to value the use of SFDVS associated or not with aquatic exercise as a form of treatment in the process of repair of the calcaneus tendon of rats. For this, 84 rats of the Wistar strain underwent surgical induction with partial transection of the calcaneus tendon. The animals were randomly divided into four treatment groups and subdivided into three periods (7, 14 and 21 days) containing 7 animals in each: Control (L); SFDVS (LS); and aquatic exercise (LE); SFDVS associated with aquatic exercise (LSE). The volume of edema was evaluated 24 h, 7, 14 and 21 days after the surgical procedure. Histological sections of the calcaneus tendon were evaluated for quantification of collagen (Masson's Trichrome and Picrosirius Red) and pathological changes by the analysis of slides stained with HE. The Bonar score was used to evaluate cell morphology, cellularity, vascularization and accumulation of fundamental substance. The comparison between the experimental groups was performed using Kruskal-Wallis and ANOVA tests, with a significance level of 0.05. A greater reduction in animal edema was observed from the seventh day on in all treatments ($p < 0.002$), when compared to the control group. After 7 and 14 days of treatment, the LE presented the greatest reduction in the volume of edema ($p = 0.03041$) compared to the control. After 21 days of treatment (LS) it was the one that presented the greatest reduction of edema compared to the control group. By quantifying collagen, it was possible to verify an increase in its concentration for LSE not the period evaluated after 21 days of treatment. Histopathological analysis using Bonar score showed a significant improvement in histopathological characteristics in tendons of animals treated with (LSE21), presenting statistically lower score values when compared to the other groups. Thus, the SFDVS associated with aquatic exercise positively influenced the repair of the calcaneus tendon, becoming a promising treatment for future clinical applications.

Keywords: Fibrin Sealant Derived from Snake Venom, Rupture of the Calcaneus Tendon, Aquatic Exercise.

DIVULGAÇÃO E TRANSFERÊNCIA DE CONHECIMENTO

O presente trabalho teve o objetivo de avaliar o uso do Selante de Fibrina Derivado do Veneno de Serpente associado ou não ao exercício aquático como forma de tratamento para restaurar tendão calcâneo de ratas. Em nossos resultados foi possível observar os efeitos positivos desse tratamento. Verificou-se redução do edema resultante do processo inflamatório na pata dos animais, quando comparado ao grupo sem nenhum tratamento. Mediante a quantificação do colágeno foi possível verificar um aumento de sua concentração, levando a crê, que o tratamento acelerou o processo de reparo do tendão, diminuindo assim o tempo de recuperação. Esse estudo também demonstrou uma melhora significativa das características histopatológicas nos tendões de animais aqui tratados. Desta forma, o SFDVS associado ou não ao exercício aquático influenciou de forma positiva na reparação do tendão calcâneo tornando-se um recurso terapêutico promissor para futuras aplicações clínicas.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Microscópio cirúrgico D. F. Vasconcellos.....	29
Figura 2: Selante de fibrina, Crioprecipitado de sangue bubalino e cloreto de cálcio.	30
Figura 3: Termômetro Thermo-Hygrometer Clock.....	31
Figura 4: Representação esquemática do Plestismômetro	32
Figura 5: Fluxograma representativo dos procedimentos realizados para a produção da dissertação	36
Figura 6: Comparação intragrupos para o peso dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associada ao exercício aquático	37
Figura 7: Comparação intergrupos para o volume de edema de 24h dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.....	38
Figura 8: Comparação intragrupos para o volume de edema de 24h dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático	39
Figura 9: Comparação intergrupos para o volume final de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.....	40
Figura 10: Comparação intragrupos para o volume final de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.....	41
Figura 11: Imagem representativa dos achados de análise do colágeno após 7 dias da indução da lesão.	42
Figura 12: Aspectos histológicos, sete dias de evolução.	43
Figura 13: Aspectos histológicos, 14 dias de evolução.	44
Figura 14: Aspectos histológicos, 21 dias de evolução.	46
Figura 15: Comparação intergrupos para o score de H.E. dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.	48

Figura 16: Comparação intragrupos para o score de H.E. dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.	49
Figura 17: Comparação intragrupos para o score de Tricrômico de Masson dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.	50
Figura 18: Comparação intergrupos para o score de tricrômico de Masson dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.....	50
Figura 19: Comparação intragrupos para o Escore de Picosírus Red dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.....	52
Figura 20: Comparação intergrupos dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Organização dos animais para o experimento	29
Tabela 2: Dados relativos à média, desvio padrão, mediana, quartis, valor mínimo e máximo do peso dos animais submetidos ou não tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado ao exercício aquático.	36
Tabela 3: Dados relativos à média e desvio padrão do volume inicial de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associada ao exercício aquático.	38
Tabela 4: Dados relativos à média e desvio padrão do volume final de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado ao exercício aquático.	39
Tabela 5: Escore histológico de Bonar	47
Tabela 6: Representação das médias de colágeno entre os grupos para o ensaio de coloração com Tricrômico de Masson.....	51

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SIMBOLOS

CEVAP: Centro de estudos de venenos e animais peçonhentos

FDA: *Food and Drug Administration* (Administração de alimentos e medicamentos dos Estados Unidos da América)

GLy-X-Y: Aminoácido glicina X e Y

L: Grupo Controle Lesão

LE: Grupo Lesão + Exercício aquático

LS: Grupo Lesão + Selante de fibrina

LSE: Grupo Lesão + Selante de fibrina associado a Exercício aquático

MEC: Matrix extracelular

SFDVS: Selante de fibrina derivado do veneno de serpente

TNF- α : Fator de necrose tumoral alfa

UNESP: Universidade Estadual Paulista

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
2 OBJETIVOS	20
2.1 Objetivo geral	20
2.2 Objetivos específicos	20
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	21
3.1 Tendão.....	21
3.2 Acometimento da lesão do tendão calcâneo	22
3.3 Formas de tratamento.....	23
3.4 Selante de fibrina derivado de veneno de serpente	25
3.5 Exercício físico no meio aquático.....	26
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	28
4.1 Animais	28
4.2 Procedimentos anestésicos	29
4.3 Protocolo de indução da lesão tendínea e aplicação do selante de fibrina	29
4.4 Protocolo de exercício aquático	30
4.5 Análises do edema.....	31
4.6 Eutanásia	32
4.7 Fixação das amostras de tendão calcâneo	33
4.8 Análise histológica	33
4.9 Quantificação do colágeno.....	34
4.9.1 Picrosirius Red.....	34
4.9.2 Tricrômico de Masson.....	34
4.10 Análises estatísticas.....	35
5 RESULTADOS	36
5.1 Composição do peso dos animais	36
5.2 Volume do edema 24h após a cirurgia.....	37

5.3 Comparação intergrupos do volume de edema final.....	39
5.4 Comparação intragrupos do volume de edema final.....	41
5.5 Análise histopatológica	42
5.5.1 Evolução temporal	42
5.5.2 Escore de Bonar	47
5.6 Quantificação do Colágeno.....	49
5.6.1 Coloração por Tricrômico de Masson	49
5.6.2 Coloração de <i>Picrosirus Red</i>	51
6 DISCUSSÃO	54
7 CONCLUSÃO.....	58
REFERÊNCIAS.....	59
ANEXO.....	69

1 INTRODUÇÃO

O tendão é formado por tecido conjuntivo denso modelado composto por fibroblasto e matriz extracelular (MEC), nos quais se encontram submersos as fibras de colágeno e elastina. A principal função dos tendões é conectar os músculos aos ossos, mas também são responsáveis por resistir à tensão e auxiliar no movimento (DIETRICH, 2012). Macroscopicamente o tendão apresenta coloração esbranquiçada e microscopicamente, é encontrado maior deposição de colágeno tipo I e em menor quantidade de colágeno tipo III (PESSOA, 2017).

O tendão calcâneo é o maior tendão do corpo humano, formado por fibras dos músculos sóleo e gastrocnêmico e apesar de sua alta resistência biomecânica, se rompe com frequência, geralmente em decorrência de práticas esportivas, repetitivas e de intensas cargas mecânicas. (HOLMS *et al.*, 2014).

A incidência de rupturas aumentou continuamente nas últimas quatro décadas (LAZARONI, 2018). Apesar de ocorrer em qualquer idade são mais frequentes na faixa etária entre 30 e 50 anos, predominando em indivíduo do sexo masculino (HOLMS *et al.*, 2014). Essas lesões também estão relacionadas com envelhecimento, pois os tendões pouco a pouco vão perdendo sua elasticidade e resistência. A perda de conteúdo hídrico, proteoglicanos, glicoproteínas, elastina, além de um atraso da atividade dos tenócitos levando a um desequilíbrio na matriz do tendão, tornando-o dessa forma, propício a constituir lesões (OLIVEIRA, 2017).

Traumas tendíneos constituem um desafio constante na medicina ortopédica, o que estimula o desenvolvimento de pesquisas e tecnologias que visem o aperfeiçoamento e aceleração do processo de reparo do tendão lesionado (FRAUZ, 2019).

As técnicas de tratamentos dessa lesão são na sua maioria indicações para procedimentos cirúrgico e não cirúrgico (método conservador), contudo, estas técnicas podem desencadear diversas complicações ao paciente (OLIVEIRA, 2018). O método cirúrgico está associado a baixo risco de reruptura e ao retorno precoce às atividades, porém apresenta alto risco de complicações, tais como, aderência cicatricial que se forma devido ao crescimento acelerado e desorganizado de fibras de colágenos no local interno da cirurgia; infecções e formação de quelóide (formação de cicatriz de má qualidade) impossibilitando um integro reparo (DIETRICH, 2012). Já o método conservador, que consiste na imobilização gessada até que ocorra a

cicatrização do tendão, é uma técnica minimamente invasiva que apesar de reduzir as taxas de complicações do processo inflamatório, eleva as taxas de rupturas. Em função das discordâncias, dos métodos de tratamentos utilizados, muitos estudos experimentais em modelo animais estão sendo desenvolvidos com a finalidade de substituir os tratamentos tradicionais (CRESTE, 2015; WALDEN *et al.*, 2017).

Diversos recursos terapêuticos podem ser utilizados com a finalidade de aceleração do reparo tendíneo, dentre eles está o Selante de Fibrina Derivado do Veneno de Serpente (SFDVS). Este novo selante previamente identificado de heterólogo é um biopolímero oriundo de uma enzima semelhante à trombina, obtida a partir de veneno de cobra e fibrinogênio bubalino (BISCOLA, 2017). O selante de fibrina heterólogo é dotado de propriedades adesivantes e hemostáticas, seu uso promove: adesão; estabilidade tecidual; controle de sangramentos em áreas cirúrgicas; aceleração do processo de cicatrização tecidual. Além de substituir os selantes constituintes de componentes humanos disponíveis no mercado (BARROS *et al.*, 2016).

Este produto foi desenvolvido por pesquisadores do Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) da Universidade Estadual Paulista (UNESP) para substituir os produtos derivados de sangue humano, como meio de evitar a transmissão de doenças infecciosas (CASSARO, 2019). Ele tem a finalidade de imitar as etapas finais da cascata de coagulação sanguínea, formando um coágulo fisiológico estável de fibrina que auxilia no controle das hemorragias e na cicatrização de feridas (OZDENKAYA, 2019). Além disso, os estudos demonstraram que o selante promove a diminuição do edema, alteração no limiar de dor por proteger as terminações nervosas, garante a hidratação do leito da ferida, não apresenta reações adversas e de fácil aplicação (BISCOLA, 2017).

Outra alternativa de tratamento, têm sido exercícios aquáticos, auxiliando na reabilitação de várias doenças em função dos benefícios que as propriedades físicas da água proporcionam ao praticante, como pressão hidrostática, viscosidade e temperatura (SILVA, 2011). O exercício realizado no meio aquático é um método de tratamento que auxilia no aumento da amplitude de movimento articular, reeduca os padrões normais de mobilidade, melhora a função muscular, reduz a atrofia musculoesquelética e limita os déficits proprioceptivos (MUÑOZ, 2019).

O procedimento empregado para reparar lesões traumáticas parciais em tendões calcâneos de ratas, com a utilização do selante fibrina derivado do veneno

de serpente poderá apresentar novas possibilidades para reparo tendíneo. E este, quando associado ao exercício aquático poderá, auxiliar na amplitude de movimento, flexibilidade e conseqüentemente proporcionar relaxamento muscular, evitando desta forma, complicações como edemas, dores e espasmos musculares, além de reduzir o tempo de recuperação (SILVA, 2011).

Desta forma, o presente estudo propõe analisar o processo de reparo e possíveis alterações nas quantidades de colágeno total nos tendões com uso do SFDVS isolado ou associado ao exercício aquático. Espera-se estabelecer o melhor tratamento para lesões no tendão calcâneo.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o efeito do selante de fibrina derivado do veneno de serpente associado, ou não, ao exercício aquático como forma de tratamento de lesão aguda do tendão calcâneo em ratas.

2.2 Objetivos específicos

- Verificar os efeitos dos tratamentos na redução do edema em tendões calcâneos de ratas submetidas a trauma;
- Verificar a qualidade da reparação tecidual, presentes no processo de reparo das lesões calcâneas;
- Analisar possíveis alterações nas quantidades de colágeno total nos tendões dos diferentes tratamentos;
- Comparar qualitativamente os dados histológicos obtidos através da coloração Hematoxilina-Eosina entre os grupos tratamento e o controle;
- Comparar quantitativamente os dados histológicos obtidos através da coloração Tricômico de Masson entre os grupos tratamento e o controle.
- Comparar quantitativamente os dados histológicos obtidos através da coloração Picrosírius Red entre os grupos tratamento e o controle.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Tendão

Os tendões são formados por tecidos conjuntivos, bem organizados e fibrosos que conectam os músculos aos ossos, compostos, sobretudo por fibras de colágenos, proteína de importância fundamental na constituição da matriz extracelular. Exerce um importante papel no sistema musculoesquelético, transferindo cargas elásticas das articulações estabilizadoras musculares, permitindo desta forma o movimento adequado dos membros (DUEK, 2014).

Os tendões tendem a sofrer adaptação mecânica em resposta a forças de tensões, nas quais eles estão sujeitos, alterando sua estrutura, composição e propriedades mecânicas. No entanto, uma adaptação anormal a essas cargas pode desencadear lesões. Uma vez lesado, dependendo da gravidade, pode levar meses para o reparo completo. Contudo, as características biomecânicas podem não voltar à normalidade. (OLIVEIRA, 2018).

O colágeno representa aproximadamente 65 - 85% do peso seco do tendão, cuja principal função é permitir resistência biomecânica aos tendões. Deste, aproximadamente 95% é constituído por colágeno tipo I (ARTHUR, 2016), acomodado e alinhado, com ligações cruzadas estáveis que atribuem aos tendões à possibilidade de alongarem-se em estímulos mecânicos e absorverem as forças resultantes, possibilitando desta forma a realização do movimento (WALDEN *et al.*, 2017). Menos de 10 % corresponde a colágeno tipo III, além da presença de pequenas quantidades de outros tipos de colágeno (NOGUEIRA, 2017). Geralmente o aumento da quantidade de colágeno tipo III nos tendões, está relacionado, a diminuição da fibra de colágeno do tendão em estado patológico e na fase de reparo (ARTHUR, 2016).

As fibras colágenas dos tendões estão dispostas de forma a proporcionar maior resistência às forças que agem sobre o tecido, durante a realização dos movimentos, sejam elas, longitudinais, transversais, horizontais e rotacionais. Esta organização resulta em fascículos de fibras que contêm unidades menores denominadas fibrilas, que por sua vez se apresentam longas e extremamente alinhadas. A evolução dessa estrutura ocorre em consequência à adaptação funcional normal dos tendões (DIETRICH, 2012; ARTHUR, 2016; WALDEN *et al.*, 2017).

As fibrilas são as principais unidades que formam as fibras de colágeno. As fibrilas de colágenos são constituídas por três cadeias polipeptídicas α arranjadas em

tripla- hélice, denominada de tropocolágeno (CARVALHO, 2015). Cada cadeia contém uma sequência de aminoácido repetitiva GLy – X- Y, onde GLy corresponde ao aminoácido glicina e X e Y e podem representar qualquer aminoácido (OLIVEIRA, 2017). A posição X, geralmente ocupada por prolina (aminoácido ajuda na formação do colágeno, importante para o funcionamento adequado) e a posição Y é ocupada por hidroxiprolina (aminoácidos originados respectivamente da prolina e da lisina através de processos enzimáticos). A presença da prolina, hidroxiprolina e glicina são essenciais para estabilizar a tripla hélice das fibras de colágenos (ARTHUR, 2016).

3.2 Acometimento da lesão do tendão calcâneo

O tendão calcâneo é um dos mais importantes e resistentes tendões do corpo humano. Constituído por um tipo de tecido conjuntivo denso, formado pela porção distal dos músculos gastrocnêmico e sóleo (tríceps sural), com inserção no osso calcâneo, o qual tem a função de transmitir a força desses músculos, determinando a flexão plantar do tornozelo, de grande importância na realização da marcha. (KARVAT *et al.*, 2013).

Contudo, apesar de sua alta resistência rompe com certa frequência. A causa mais comum de ruptura parcial ou total de lesões tendíneas, está relacionada aos esforços excessivos e repetitivos da unidade musculotendínea, principalmente em atividades esportivas, devido às altas cargas mecânicas impostas por essas modalidades (ARTHUR, 2016). Apesar de poder acometer qualquer idade, essas lesões são mais comuns entre os 30 a 50 anos de idade, com predominância no sexo masculino (BERTELLI, 2012). Dentre os diversos fatores que envolvem a tendinopatia, estão os fatores intrínsecos, que incluem idade, sexo, variantes anatômicas, peso corporal e doença sistêmica e os extrínsecos que incluem atividades esportivas, carga física, ocupação e condições ambientais (DOCHEVA, 2015). O tecido tendíneo possui baixa capacidade de regeneração em consequência de sua baixa vascularidade, oxigenação e nutrição. Contudo, diversos estudos evidenciam que quando o tendão lesado é estimulado por meios biofísicos adequados este pode cicatrizar adequadamente (OLIVEIRA, 2017).

O procedimento para a reabilitação do tendão visa restabelecer a funcionalidade e a integralidade do tecido lesionado. Neste evento, surgem inevitáveis sucessões de acontecimentos, que envolvem reações bioquímicas e celulares,

decompostos em três fases, são elas: a fase inflamatória, seguida da fase proliferativa e, por fim, a fase de remodelação (FARCIC *et al.*, 2012).

Fase inflamatória ocorre logo após o trauma, com duração aproximadamente de 7 dias com formação de edema e hematoma no local. Logo após à hemóstase, é ativada a cascata de vasodilatadores e plaquetas, bem como sinais pró-inflamatórios, que atraem as células inflamatórias para o local da lesão. Os fibroblastos recrutados, para o local, começam sintetizar diversos componentes da MEC, principalmente colágeno tipo III (CHESTER; BROWN, 2017). A fase proliferativa é marcada por um pico de aproximadamente 14º dia. O recrutamento contínuo de fibroblastos estimula a população local de tenócitos a sintetizar colágeno tipo III e outros componentes extracelulares, formando uma rede irregular e desorganizada no local da lesão (WU *et al.*, 2017). A fase de remodelação se inicia, após cerca de 21 dias ou mais após a lesão, com a redução de fibroblastos e síntese da MEC, as fibras de colágenos começam a se alinharem longitudinalmente ao longo do eixo do tendão. À medida que o reparo entra em maturação o colágeno tipo III gradativamente é substituído pelo colágeno tipo I (ARTHUR, 2016).

Após a lesão do tendão o tecido formado é modificado tanto na sua estrutura quanto na sua composição. O trauma tendíneo está associado à redução de colágeno tipo I, resultando em um tendão fraco e com baixa capacidade de suportar carga mecânica. O aumento da quantidade de colágeno tipo III muito menos organizado prejudica a função do tecido, resultando em diminuição da mobilidade e aumento de dor (WALDEN *et al.*, 2017).

Lesões tendínea estão entre os problemas ortopédicos mais comuns em consequência ao longo do período de cicatrização, por apresentar uma menor resistência biomecânica e a elevadas taxas de recorrência após a lesão inicial. Com isto, diversas estratégias têm sido estudadas com o intuito de tornar o processo de reparo tendíneo o mais próximo da sua forma original (FRAUZ *et al.*, 2019).

3.3 Formas de tratamento

Há muitas discussões na literatura sobre a escolha do melhor procedimento a ser utilizado para o tratamento de lesões em tendões, seja ele cirúrgico ou não cirúrgico (convencional) bem como, a forma de melhor conduzir cada tipo de tratamento (MOREIRA, 2016). A técnica cirúrgica aberta foi considerada por muitos anos, como modelo padrão por apresentar baixo índice de re-ruptura e restaurar a

força do tríceps sural. Porém esta técnica apresenta diversas complicações incluindo, infecção profunda, formação de queloide e necrose da ferida (LAZARONI, 2018). Já o método conservador como a imobilização é uma técnica minimamente invasiva, porém apresenta altas taxas de rerupturas e longos períodos de imobilização, provocando enrijecimento do tornozelo e fraqueza muscular (MOREIRA, 2016).

Sabe-se que a qualidade do reparo do tecido tendíneo é em grande parte dependente do modo como o colágeno se organiza. Diversas pesquisas apontam que a forma de distribuição e remodelamento do colágeno na matriz extracelular ao longo do processo do reparo tendíneo é influenciada pelo o método de tratamento (FRASSON *et al.*, 2009).

Com a finalidade de obter as condições ideais e semelhantes às dos tecidos originais, e obter a cura das lesões tendíneas, novos métodos vêm sendo desenvolvidos com a utilização de modelos experimentais, como o transplante com célula tronco mesenquimais (LEE *et al.*, 2017), dieta de glicina (VIEIRA *et al.*, 2015) e aplicação de terapia de LED e laser de baixa potência (PARENTE *et al.*, 2013). Os biomateriais também têm sido bastante utilizados como forma de tratamento.

Os biomateriais são quaisquer substâncias ou combinações de substâncias, naturais ou não, ausentes de drogas ou fármacos, que interagem com sistemas biológicos, objetivando tratar, aumentar ou substituir quaisquer tecidos, órgãos ou funções do corpo (CASSARO, 2019). Para que estes polímeros biodegradáveis sejam ideais, devem cumprir aos seguintes parâmetros: não ser tóxicos; dispor biocompatibilidade; atestar boas propriedades mecânicas e de flexibilidade e biodegradabilidade controlada; ser naturalmente formado como uma estrutura porosa e ter propriedades termoplásticas apropriadas (LIMA, 2019).

Dependendo da sua composição química, os biomateriais podem ser classificados como naturais ou sintéticos. Em relação à sua origem, são: autógenos (obtidos do próprio doador); alógenos (obtidos de indivíduos da mesma espécie do receptor); xenógenos (obtidos de espécie diferente do receptor) e aloplásticos (obtidos de materiais sintéticos-cerâmico, metálico e polimérico) (CRESTE, 2015).

Dentre os diversos biomateriais, o selante de fibrina tem se destacado como uma excepcional alternativa de tratamento com bastante êxito em diversos procedimentos cirúrgicos e reparos teciduais (BARROS, 2016).

3.4 Selante de fibrina derivado de veneno de serpente

A fibrina é um dos principais componentes do processo de reparo e tem duas funções principais. A primeira, criar um ambiente que ofereça as condições ideais e semelhantes às dos tecidos originais para que células ou tecidos se estabeleçam e proliferem satisfatoriamente. A segunda, acelerar o processo de reparo de feridas e lesões, reduzindo risco de hemorragia e de doenças infectocontagiosa (CASSARO, 2019).

O selante de fibrina comercial homólogo é um biomaterial composto de proteínas do plasma humano, formados por dois componentes principais: fibrinogênio humano e trombina obtida de sangue humano ou bovino, que, uma vez combinados, formam uma matriz de fibrina bioativa com propriedades hemostática (controlar hemorragias) e de reparo do tecidual (CASTRO, 2015).

Os primeiros estudos utilizando o selante de fibrina datam da Segunda Guerra Mundial, sendo comercializado com sucesso por anos, porém em 1978, a Administração de Alimentos e Medicamentos dos Estados Unidos (FDA- *Food na Drug Administration*) suspendeu sua comercialização devido as preocupações com o risco de transmissão de algumas doenças virais, transmitidas por produtos derivados de sangue humano. Com objetivo de sanar este problema, na década de 1990 surgiu o interesse dos pesquisadores em desenvolver novo selante que apresentasse vantagens quando comparado aos produtos já disponíveis no mercado, produzido apenas a partir de componentes animais, sem risco de doenças infecciosas e menores custos de produção (FERREIRA *et al.*, 2017).

O selante de fibrina heterólogo, derivado de uma serina protease uma enzima semelhante à da trombina é um composto, produzido basicamente de produtos extraídos do veneno de serpentes *Crotalus durissus terrificus* associado a um crioprecipitado rico em fibrinogênio extraído do sangue de *Bubalus bubalis búfalo* (CRESTE, 2015; FERREIRA *et al.*, 2017).

Este selante de fibrina heterólogo foi desenvolvido por pesquisadores do Centro de Estudos de Veneno e Animais Peçonhentos (CEVAP), da UNESP – São Paulo, vem sendo empregado em diversos experimentos e procedimentos clínicos e pré-clínicos, tais como: em cirurgia periodontal (BARBOSA, *et al*, 2008); na cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos (PERES, 2013); para reimplante de raízes ventrais medulares após avulsão (CASTRO, 2015); na reparação do ramo bucal do nervo facial

(BUCHAIM, 2016); em rinoplastia aberta (YU *et al.*, 2018); e no tratamento de úlceras venosas crônicas (CAVASSAN, 2020).

3.5 Exercício físico no meio aquático

O exercício físico tem sido relacionado a inúmeros benefícios ligados à saúde, especialmente à função imune como no caso de processos inflamatórios. Porém de acordo com o tipo, intensidade, frequência e duração, eles podem ocasionar alguns prejuízos ao organismo. (LANA, 2008). O processo inflamatório pode ser caracterizado como uma resposta de defesa do organismo, ou seja, atua destruindo fagocitose e anticorpos, diluindo o plasma extravasado e isolando ou retendo malha de fibrina, o agente agressor, cujo objetivo é promover reparo ou cura. (SILVA, 2011). Evidências epidemiológicas têm mostrado que o exercício físico moderado realizado frequentemente, favorece aceleração dos processos de reparo inflamatório, promovendo quimiotaxia e aumento da capacidade destas células tanto em animais, quanto em humanos (LANA, 2008).

Muitos são os benefícios agregados ao uso da água no tratamento de lesão tendínea. Em geral todos os efeitos biológicos que a água proporciona estão relacionados às propriedades físicas da água, dentre elas destacam-se densidade, pressão hidrostática, viscosidade e temperatura (GREGUOL, 2010). De acordo com o Princípio de Arquimedes, quando um corpo está completamente ou parcialmente submerso em repouso em um líquido, ele sofrerá um empuxo para cima igual ao peso do volume de líquido deslocado, resultando na flutuação (FERRREIRA *et al.*, 2017).

No contexto das terapias, a flutuação servirá de suporte ao corpo (sustentação), quando realizar movimentos em direção à superfície da água e resistirá (resistência) a qualquer movimento realizado na direção oposta à superfície deste líquido. (DELGADO *et al.*, 2004).

A densidade é uma grandeza física que mede quanto há de massa de um corpo por unidade de volume. A densidade corporal do homem varia de indivíduo para indivíduo e se modifica para diferentes partes do corpo. A capacidade de um indivíduo flutuar será influenciada por seu volume, densidade corporal, capacidade pulmonar e percentual de gordura (STANKOVIÇ *et al.*, 2019).

A pressão hidrostática é exercida de forma igual sobre todas as direções das áreas de um corpo submerso em repouso a uma determinada profundidade. E esta pressão aumenta de acordo com a profundidade e a densidade do líquido.

(MCINTYRE, 2019). A viscosidade surge da fricção interna do líquido produzida pela atração molecular. (GREGUOL, 2010).

A temperatura da água e a qualidade de calor produzido pelo corpo necessitam ser levados em consideração, na determinação de uma temperatura adequada e confortável para o paciente se exercitar. (FACCI *et al.*, 2007).

Nesse sentido, o exercício realizado no meio líquido é um recurso terapêutico que tem sido bastante utilizado na área da saúde para se alcançar uma rápida recuperação e melhora dos pacientes com problemas ortopédicos, devido aos benefícios provenientes das propriedades físicas da água e efeitos fisiológicos descritos acima. (FACCI *et al.*, 2007).

Os exercícios na água são muito bem tolerados, especialmente em água aquecida, pois o ambiente morno ajuda a reduzir a dor e espasmos musculares. A água oferece suave resistência durante os movimentos e, ainda, a oportunidade de treinamento em várias velocidades. Esses componentes fazem com que o exercício aquático seja um excelente método para aumento da resistência e força muscular (KUNDURACILAR *et al.*, 2018).

Exercício físico praticado frequentemente possuem qualidades necessárias para possibilitar aceleração dos processos de reparo tecidual e inflamatório. Tendo os exercícios aeróbios os mais evidenciados nesse processo, promovendo a migração de leucócitos em direção ao local da lesão, aumentando a capacidade de fagocitose dessas células e a atividade de macrófagos (ADABBO, 2012).

O treinamento aeróbio constitui-se de exercícios de baixa ou moderada intensidade e longa duração, em que as fibras musculares são sujeitadas a sobrecargas repetidas e progressivas por um longo período, demandando desse modo, o metabolismo oxidativo para sua execução (VEIRA, 2004).

O exercício realizado no meio líquido proporciona uma variedade de efeitos fisiológicos podendo dessa forma, promover benefícios ao processo de reparo tecidual, sendo notável: o aumento da circulação periférica; aumento no suprimento de oxigênio e nutrientes ao músculo ativo; aumento no retorno sanguíneo e linfático; redução de edemas pela ação hidrostática e redução da sensibilidade dos terminais nervosos que em conjunto, promovem relaxamento muscular (MUÑOZ *et al.*, 2019).

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Animais

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do do Piauí (UESPI) protocolo número 0326/2019. Foram utilizados 84 *Rattus norvegicus* fêmeas, pertencentes à linhagem *Wistar*, com aproximadamente 60 dias de idade, obtidas e acomodadas no biotério da Universidade Estadual do Piauí (UESPI) Teresina – Piauí. Com peso médio de 206 g e submetidos cirurgicamente à secção transversal parcial na pata inferior direita de cada rata. Os animais foram mantidos em fotoperíodo claro-escuro de 12 horas, com temperatura de 24 ± 1 °C, com livre acesso a água e ração. Estes animais foram mantidos nestas condições por um período de adaptação de 10 (dez) dias, antes do início dos experimentos.

Os roedores foram separados aleatoriamente em quatro grupos experimentais (**tabela 1**), sendo que: Cada grupo foi subdividido em outros três subgrupos, contendo sete ratas cada, das quais foram avaliadas em seus respectivos tempos: 7, 14 e 21 dias.

- Grupo Controle Lesão (L), grupo em que as ratas sofreram lesão parcial do tendão, sem receber nenhum tipo de tratamento;
- Grupos Selante Fibrina Derivado de Veneno de Serpente (LS), grupo que as ratas sofreram lesão parcial do tendão e tratados com selante;
- Grupo Exercício Aquático (LE), grupo em que as ratas sofreram lesão parcial do tendão e tratados com exercício aquático;
- Grupo Selante Fibrina Derivado de Veneno de Serpente mais Exercícios aquáticos (LSE), grupos em que as ratas sofreram lesão parcial do tendão e tratados com o selante e exercícios aquáticos.

De acordo com o grupo experimental descrito, o treino foi realizado de segunda a sexta. Todos os animais foram eutanasiados nas datas programadas, por sobre dose de Tiopental sódico (100mg/kg) via intraperitoneal (DIETRICH,2012).

Tabela 1: Organização dos animais para o experimento

Grupo	Animais	Exercício aquático	Selante de fibrina
L	21	ausente	ausente
LE	21	presente	ausente
LS	21	ausente	presente
LSE	21	presente	presente

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

4.2 Procedimentos anestésicos

Os animais foram inicialmente pesados para estabelecer a dose do anestésico a ser ministrado. A anestesia geral foi realizada por injeção via intraperitoneal, com uma associação na mesma seringa de cloridrato de Cetamina 80 mg/kg e cloridrato de Xilazina a 10 mg/kg. (PERES, 2013).

4.3 Protocolo de indução da lesão tendínea e aplicação do selante de fibrina

Previamente ao procedimento cirúrgico, foi realizada a tricotomia e assepsia na pata inferior direita de cada rata. A assepsia foi efetuada com álcool 70 %. Em seguida, com lâmina bisturi número 11, uma incisão longitudinal posterior de aproximadamente 3 milímetros de comprimento, foi realizada na pele do animal em direção proximal, iniciada 5 milímetros proximal à tuberosidade do calcâneo, para exposição do tendão. Logo após, foi realizada uma transecção parcial na porção intermediária do tendão calcâneo. Para em seguida, realizar a aplicação do selante. Este procedimento foi efetuado com auxílio de um microscópio cirúrgico D. F. Vasconcellos (**figura 1**) (DIETRICH, 2012).

Figura 1: Microscópio cirúrgico D. F. Vasconcellos

Fonte: Autoria própria

O selante de fibrina composto pela fração semelhante à trombina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, crioprecipitado de sangue bubalino e cloreto de cálcio, foi fornecido pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos da UNESP (Universidade Estadual Paulista – Brasil).

O composto foi disponibilizado em três micro tubos que foram acondicionados a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. No momento da aplicação foram descongelados, reconstituídos em estado líquido, misturados em uma seringa de 1ml e aplicados aproximadamente $9\text{ }\mu\text{L}$ em cada tendão transectado em uma única vez, para formar um coágulo estável com uma densa rede de fibrina (Frauz *et al.*, 2019). Somente os grupos selante e selante associado ao exercício físico receberam a aplicação do selante.

Figura 2: Selante de fibrina, Crioprecipitado de sangue bubalino e cloreto de cálcio.



Fonte: Autoria própria

4.4 Protocolo de exercício aquático

Todos os animais foram submetidos a um período de adaptação ao meio líquido durante 15 dias que antecederam o processo cirúrgico. Neste período, a duração dos exercícios foi aumentada gradativamente até alcançar os 10 minutos por dia. No primeiro dia iniciou-se com um minuto; no segundo, terceiro e quarto dia com 3 minutos; no quinto, sexto e sétimo dia com 5 minutos; no oitavo, nono e décimo dia com 7 minutos; no décimo primeiro, décimo segundo e décimo terceiro dia com 9 minutos e por fim, no décimo quarto e décimo quinto dia com 10 minutos permanecendo assim até o final do experimento. A carga de peso também foi aumentada gradualmente no mesmo período de 15 dias, até atingir 10% do peso corporal dos animais. Primeiro dia sem carga; no segundo, terceiro e quarto dia com 2% da carga; no quinto, sexto e sétimo dia com 5% da carga; no oitavo, nono e décimo dia com 7% da carga; no décimo primeiro, décimo segundo e décimo terceiro dia com

9% da carga e no décimo quarto e décimo quinto dia com 10% da carga. (RAJABI *et al.*, 2015). A adaptação ocorrem para todos, como forma de manter os animais o mais homogêneos possíveis com relação ao condicionamento físico.

Figura 3: Termômetro Thermo-Hygrometer Clock



Fonte: Autoria própria

Somente os grupos (LE), e (LSE) foram submetidos ao treino de exercício aquático após o a indução da lesão. O treino foi iniciado após o terceiro dia pós-operatório, desse modo a propiciar o reparo da pele do animal, reduzindo o risco de infecções e complicações como formação de cicatriz (Pestana *et al.*, 2012). Este foi realizado em um tanque de formato oval, com 50 cm de profundidade e capacidade para 100 litros. Os exercícios foram realizados com nível da água de 40 cm de profundidade e a temperatura da água controlada a 32°C utilizando um termômetro (Thermo-Hygrometer Clock) (**figura 3**).

Os animais foram pesados antes de iniciar o treinamento e uma vez por semana para, a fim de se estabelecer a carga aplicada durante o exercício (ASSIS *et al.*, 2018). Uma carga de chumbos de 10% do peso do animal foi fixada na região do peitoral com o auxílio de fita velcro, para evitar que os animais só flutuassem e garantir dessa forma, a realização do treino proposto. Os exercícios foram realizados 05 (cinco) vezes por semana de segunda a sexta-feira por um intervalo de dois (02) dias entre as semanas, com duração de 10 minutos por dia, nos períodos de 7, 14 e 21 dias (RAJABI *et al.*, 2015).

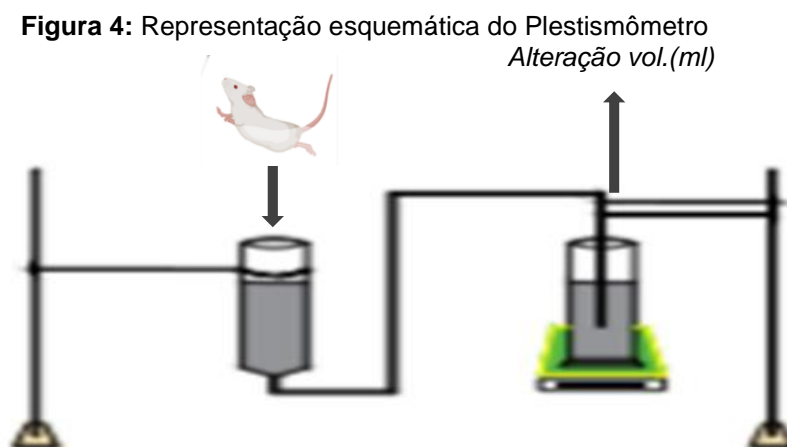
4.5 Análises do edema

As análises do edema, ocorreram em 05 (cinco) momentos distintos: A primeira avaliação (AV1) foi realizada no momento anterior à lesão tendínea. A segunda

avaliação (AV2) foi realizada 24 horas após a lesão tendínea. A terceira avaliação (AV3) após 7º dias da lesão tendínea; A quarta avaliação (AV4) foi realizada após 14º dias da lesão tendínea. Finalmente a quinta avaliação (AV5) foi realizada após 21º dias da lesão.

A avaliação do edema foi realizada na pata direita de todas as ratas, logo acima da incisão, onde foi realizada uma marcação com pincel definitivo para servir de referência. Em seguida introduziu-se a pata até a altura da marcação em um Plestismômetro de pata (**figura 4**), onde foi considerada a alteração volumétrica de líquidos (em mL), por meio do deslocamento da água, deste modo o equipamento quantificava o volume da pata.

Dessa forma, o cálculo do volume do edema da pata foi feito pela diferença entre o volume inicial da pata (antes da indução da lesão) e o volume dos períodos de avaliação descritos anteriormente. Os resultados foram expressos como aumento do volume da pata (mL). As leituras foram realizadas nos períodos citados anteriormente (KARVAT at al., 2014).



Fonte: Autoria própria

4.6 Eutanásia

Os animais foram sacrificados no 7º, 14º e 21º dias após o procedimento cirúrgico através da administração de uma overdose de anestésico Tiopental sódico (100mg/kg) (DIETRICH,2012).

4.7 Fixação das amostras de tendão calcâneo

Após o tempo de experimentação de cada grupo, foi realizado o processo de tenotomia nas ratas. O tendão calcâneo, incluindo sua inserção muscular, foi removido e fixado em formalina 10 % durante 24 horas. A seguir, os tendões foram lavados em água corrente por 24 horas. Os tendões foram então desidratados em solução crescente de álcool etílico (70 %, 90 % e 100 %).

Após a desidratação, foi realizada a diafanização das peças em solução de álcool/xilol (1:1) seguido de 2 banhos de xilol puro. Este procedimento foi realizado em um processador automático de tecidos (PT05 TS Luptec, São Paulo, Brasil). Após processamento as amostras foram embebidas em parafina.

Para cada bloco, foram feitos quatro cortes histológicos longitudinal com espessura de 5 µm utilizando micrótomo rotativo (MRP09 Luptec, São Paulo, Brasil). As lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina (HE), Tricrômico de Masson e *Picrosírius Red* (NASCIMENTO et al., 2019).

4.8 Análise histológica

A análise histopatológica da região da lesão parcial no tendão calcâneo foi realizada através das lâminas coradas com Hematoxilina e Eosina. Por meio de um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan).

Cada imagem foi classificada, de maneira cega, segundo critérios histológicos de tendinopatia, de acordo com o escore de Bonar, adaptando as recomendações de Fearon *et al* (2014).

Foram avaliados quatro parâmetro histológicos: arranjo das fibras colágenas, morfologia celular, celularidade, vascularização e acúmulo de substância fundamental. Cada parâmetro foi classificado em uma escala de 4 pontos (de 0 a 3), sendo: 0, normal; 1, ligeiramente anormal; 2, anormal; e 3, marcadamente anormal. A classificação da alteração tecidual do tendão calcâneo de cada animal foi considerada como a somatória dos escores de cada uma das quatro categorias avaliadas. Conseqüentemente, o maior valor possível do escore é 12 (doze) para um tendão com alterações patológicas máximas (CESAR DE, 2017).

As alterações teciduais do tendão do calcâneo foram avaliadas por dois profissionais com experiência. A média do escore entre os profissionais foi considerada para posterior análise.

4.9 Quantificação do colágeno

4.9.1 Picrosirius Red

Foi realizada a quantificação de colágeno através das lâminas coradas com *Picrosirius Red*. Após a escolha aleatória de um corte por lâmina, este foi fotografado em 3 campos distintos da lesão, por meio de um microscópio óptico (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan) equipado com filtros para fornecer a iluminação polarizada.

As imagens foram obtidas em um aumento de 400x com uma câmera digital acoplada ao microscópio (Sony DSCs75, Tokyo, Japão) e analisada usando software MatLab. A metodologia de análise foi realizada de acordo com Castro (2019). Para isso, as imagens foram carregadas no software sendo depois convertidas em uma máscara preto e branco de acordo com um limiar de intensidade estabelecido em 30 % do valor máximo, assim o branco representa áreas de colágeno e o preto o fundo.

Em seguida, o número de pixels brancos em cada imagem foi usado para calcular a porcentagem da área da imagem que correspondia ao colágeno. O número de pixels foi determinado e expresso em porcentagem total de colágeno.

4.9.2 Tricrômico de Masson

Foi realizada a quantificação de colágeno através das lâminas coradas com *Tricrômico de Masson*. Utilizando um microscópio de luz (Olympus, Optical Co. Ltd, Tokyo, Japan), foram obtidas 6 imagens de cada animal em cada grupo estudado.

A análise foi realizada usando software MatLab utilizando metodologia adaptada de Quinn *et al.* (2015). A imagem foi carregada no software e separada em seus três canais de cor (Vermelho - R, Verde - G e Azul - B). A razão entre os canais Azul e Vermelho (B/R) e Verde e Vermelho (G/R) foram computadas. Foram geradas duas máscaras a partir do limiar de 15 % da maior intensidade observada no canal Azul. As duas máscaras foram então combinadas utilizando-se lógica AND, assim a região branca representa áreas de colágeno em preto o fundo.

Em seguida, o número de pixels brancos em cada imagem foi usado para calcular a porcentagem da área da imagem que correspondia ao colágeno. O número de pixels foi determinado e expresso em porcentagem total de colágeno (QUINN *et al.*, 2015).

4.10 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas no software estatístico Minitab 18. A normalidade dos dados foi testada pelo teste de Anderson-Darling. As variáveis quantitativas foram apresentadas por meio de média e desvio padrão, valores mínimo, máximo, mediana e quartis. Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis para comparação entre os grupos estudados. Para todas as análises, foi considerado nível de significância de 5 %.

5 RESULTADOS

A **Figura 5** apresenta uma representação esquemática da realização do experimento até a obtenção do resultado desta dissertação, desde a obtenção dos animais até aos processos que foram realizados para análise final do edema e colágeno.

Figura 5: Fluxograma representativo dos procedimentos realizados para a produção da dissertação



Fonte: Dados da pesquisa, 2020.

5.1 Composição do peso dos animais

Os valores de média, desvio padrão, mínimo, máximo, mediana e quartis do peso das ratas são apresentados na **tabela 2**. A média e desvio padrão do peso de todos os animais, não sendo feita diferenciação entre os grupos, foi de 206 ± 24 g.

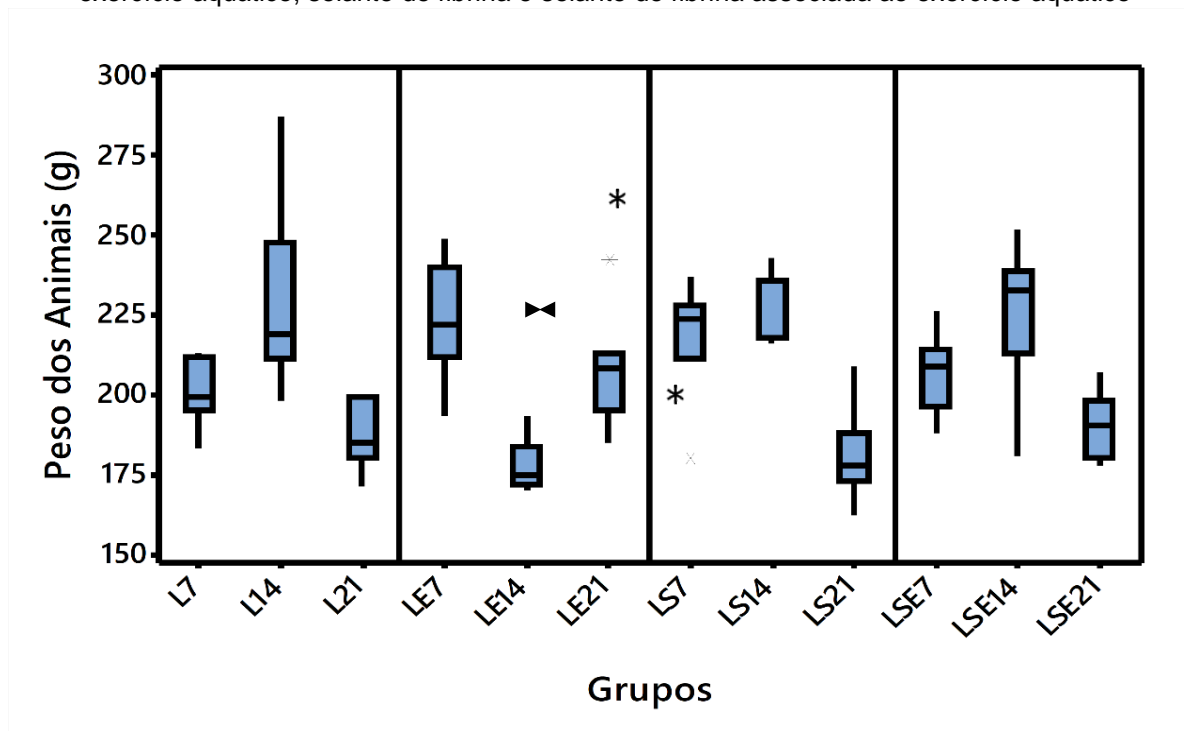
Tabela 2: Dados relativos à média, desvio padrão, mediana, quartis, valor mínimo e máximo do peso dos animais submetidos ou não tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado ao exercício aquático.

	N	Média	EP	DP	Mín.	Mediana	Máx.	Q1	Q3
Peso(g)	84	206,06	2,59	23,77	162,00	207,50	287,00	185,00	219,75

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Não houve diferença estatística entre os grupos estudados com relação ao peso dos animais (**figura 6**), indicando que os grupos apresentaram aleatoriedade em sua composição.

Figura 6: Comparação intragrupos para o peso dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associada ao exercício aquático



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

5.2 Volume do edema 24h após a cirurgia

A **Tabela 3** apresenta os valores do volume de edema 24h após a cirurgia. A comparação pareada mostrou que não houve diferença entre os resultados do volume inicial do edema 24h após a cirurgia, tanto para a comparação intergrupo (**figura 7**) quanto intragrupo (**figura 8**) ($p > 0,05$). Desta forma, o procedimento de lesão cirúrgica induziu o processo inflamatório na pata dos animais de forma igualmente distribuída em todos os grupos. O volume médio do edema após 24 h foi $0,69 \pm 0,26$ ml.

Tabela 3: Dados relativos à média e desvio padrão do volume inicial de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associada ao exercício aquático.

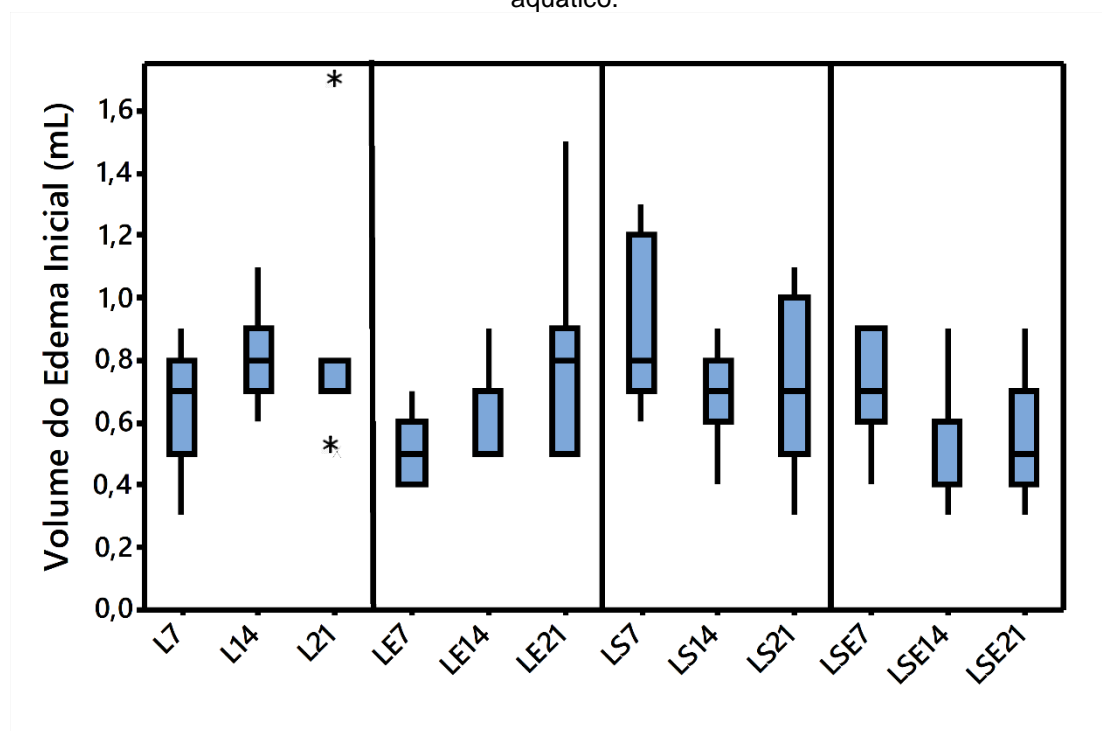
Volume do Edema Inicial (mL)				
Grupos	L	LE	LS	LSE
7 dias	0,63 ± 0,21	0,50 ± 0,11 [†]	0,89 ± 0,26 [*]	0,71 ± 0,19
14 dias	0,80 ± 0,16	0,64 ± 0,15	0,69 ± 0,16	0,50 ± 0,20
21 dias	0,84 ± 0,43	0,81 ± 0,34	0,71 ± 0,27	0,57 ± 0,21

(*) Diferença significativa comparada ao LSE14, considerando $p < 0,05$.

(†) Diferença significativa comparada ao LS7, considerando $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Figura 7: Comparação intergrupos para o volume de edema de 24h dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.

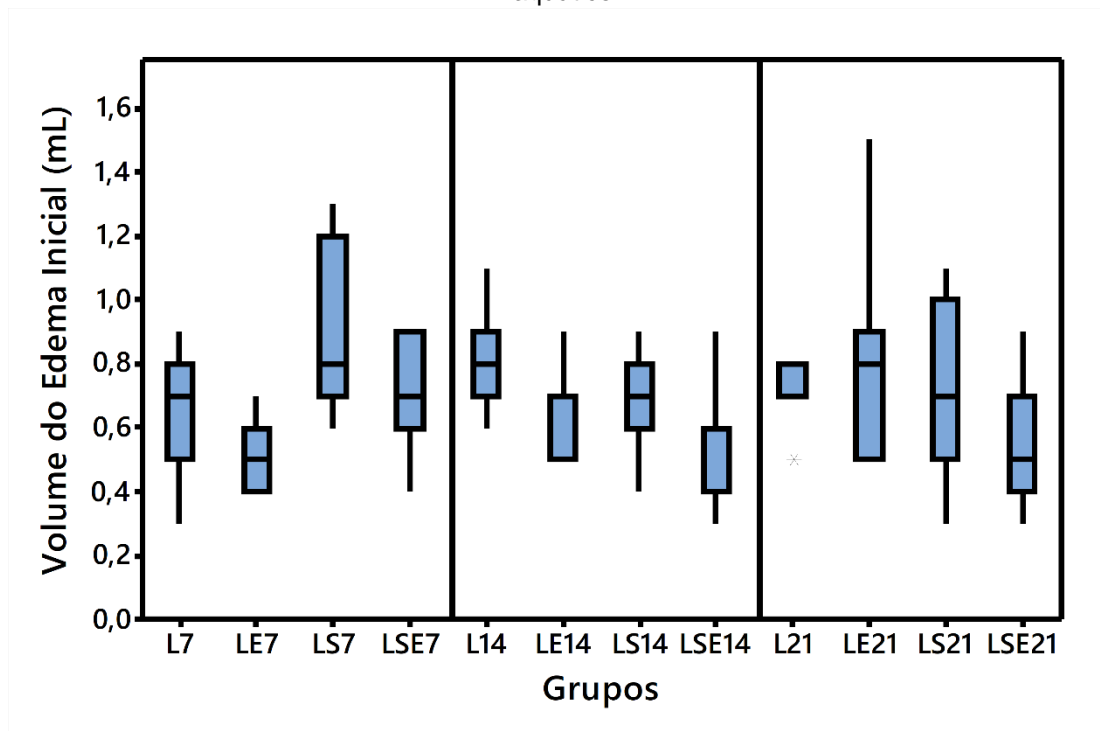


(*) Diferença significativa comparada ao LNS14, considerando $p < 0,05$.

(†) Diferença significativa comparada ao LS7, considerando $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Figura 8: Comparação intragrupos para o volume de edema de 24h dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

5.3 Comparação intergrupos do volume de edema final

A **Tabela 4** apresenta os valores de edema final para cada um dos grupos estudados.

Tabela 4: Dados relativos à média e desvio padrão do volume final de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado ao exercício aquático.

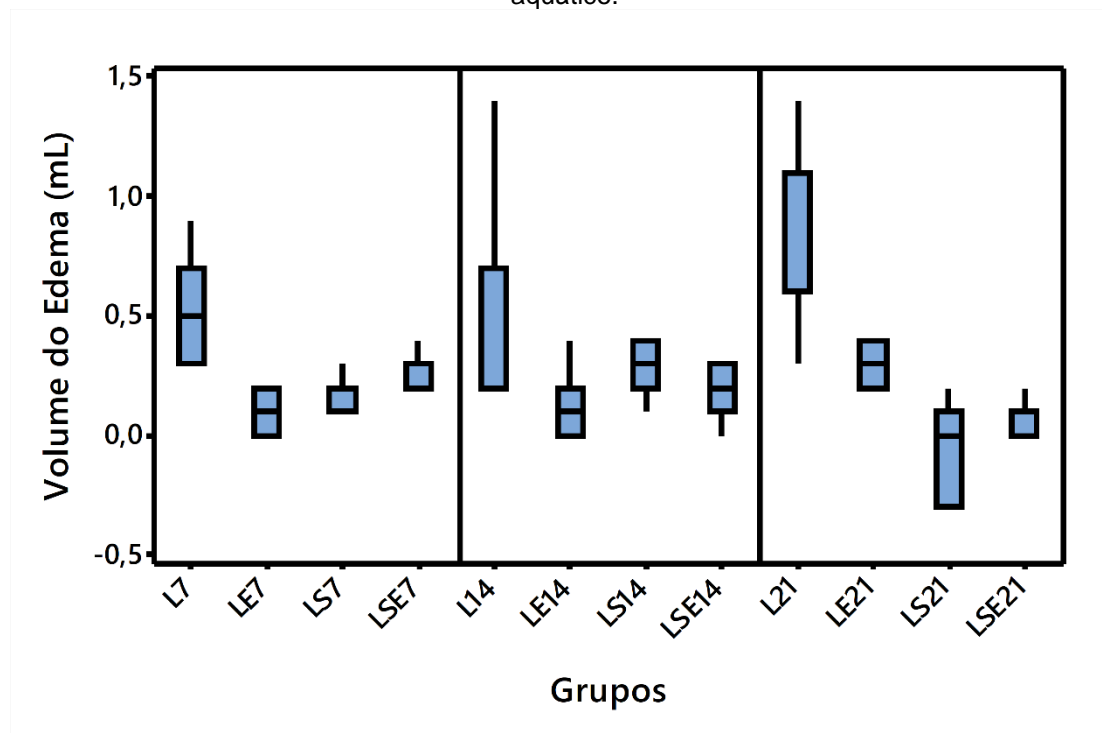
Grupos	Volume do Edema Final (mL)			
	L	LE	LS	LSE
7 dias	0,54 ± 0,23	0,11 ± 0,09	0,171 ± 0,076	0,243 ± 0,079
14 dias	0,46 ± 0,45	0,13 ± 0,15*	0,27 ± 0,11	0,19 ± 0,12
21 dias	0,80 ± 0,38	0,29 ± 0,90*	-0,04 ± 0,19*	0,057 ± 0,080*†

(*) Diferença significativa comparada ao L.

(†) Diferença significativa comparada ao LE.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Figura 9: Comparação intergrupos para o volume final de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.



(*) Diferença significativa comparada ao L, considerando $p < 0,05$.

(†) Diferença significativa comparada ao LE, considerando $p < 0,05$.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Foi possível observar que após 7 dias de tratamento, os grupos tratamento (LE7, LS7 e LSE7) apresentaram volumes de edema estatisticamente menores ($p < 0,002$), comparados ao (L7).

Após 14 dias de tratamento, somente o (LE14) apresentou valor de edema estatisticamente menor ($p = 0,03041$) que o valor do (L14).

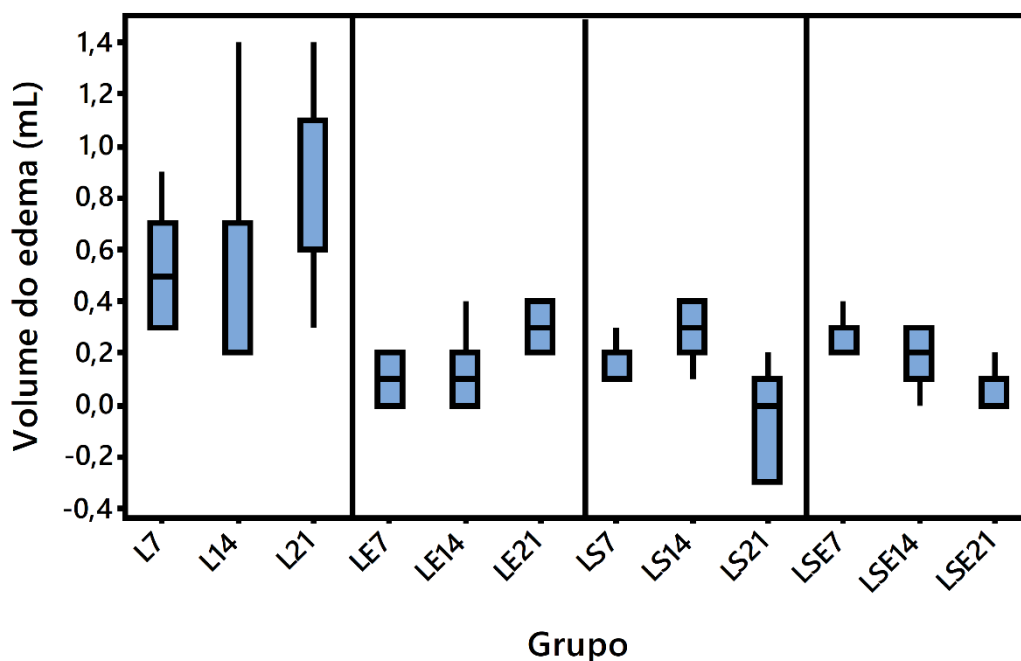
Após 21 dias de tratamento, todos os (LE21, LS21, LSE21) apresentaram volumes de edema estatisticamente menores ($p < 0,001$) que o (L 21). O (LSE21) apresentou valor de volume de edema estatisticamente menor ($p = 0,0029$) que o (LE 21).

5.4 Comparação intragrupos do volume de edema final

Na **Tabela 4**, no grupo onde foi induzida somente lesão foi observada aumento estatisticamente significativo somente L14 e L21 ($p = 0,04$), mostrando que a lesão sem tratamento teve uma evolução somente entre a segunda e terceira semana. Já no grupo tratado com exercício aquático, foi observada diferença estatisticamente maiores entre o LE21 e LE7 ($p = 0,0090$) e LE21 e LE14 ($p = 0,0096$), mostrando a evolução na redução do volume do edema quando este tratamento é utilizado.

Entre os grupos tratados apenas com selante de fibrina, foi observada valor estatística menor entre os LS 14 e LS 21 ($p = 0,0014$). Finalmente, para os grupos tratados com selante de fibrina associado à exercício aquático, foi observada diminuição estatística entre LSE 21 e LSE 7 ($p = 0,0048$), e LSE 21 e LSE 14 ($p = 0,0489$).

Figura 10: Comparação intragrupos para o volume final de edema dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.

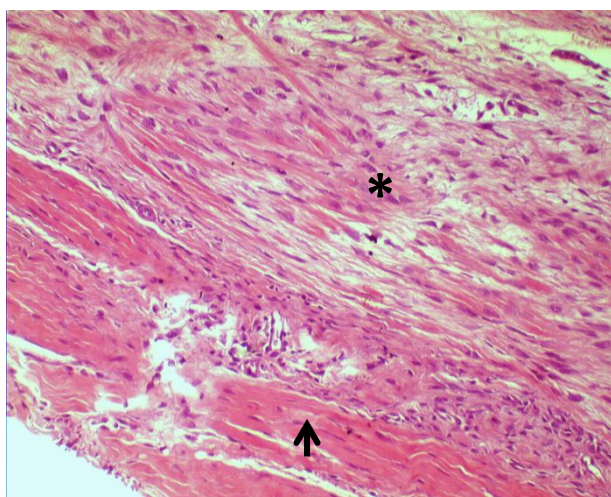


Fonte: Dados da pesquisa, 2020

5.5 Análise histopatológica

A análise histológica qualitativa dos cortes corados com HE (**figura 11**) demonstrou que a transecção parcial foi seguida de um processo típico de reparação tendínea, com participação do epitendão e do endotendão. Um aspecto comum a todos os grupos foi a proliferação de fibroblastos na área cicatricial. Após sete dias do procedimento cirúrgico, em todos os grupos a fenda resultante da tenotomia parcial se encontrava preenchida por tecido conjuntivo frouxo. A proliferação fibroblástica e a evolução do processo apresentaram diferenças entre os grupos. As subseções a seguir apresentam a análise dos principais achados histopatológicos.

Figura 11: Imagem representativa dos achados de análise do colágeno após 7 dias da indução da lesão.



Legenda: Área de transição entre o tendão não afetado (seta) o epitendão contendo numerosos fibroblastos (*).

Fonte: Dados da pesquisa, 2020]

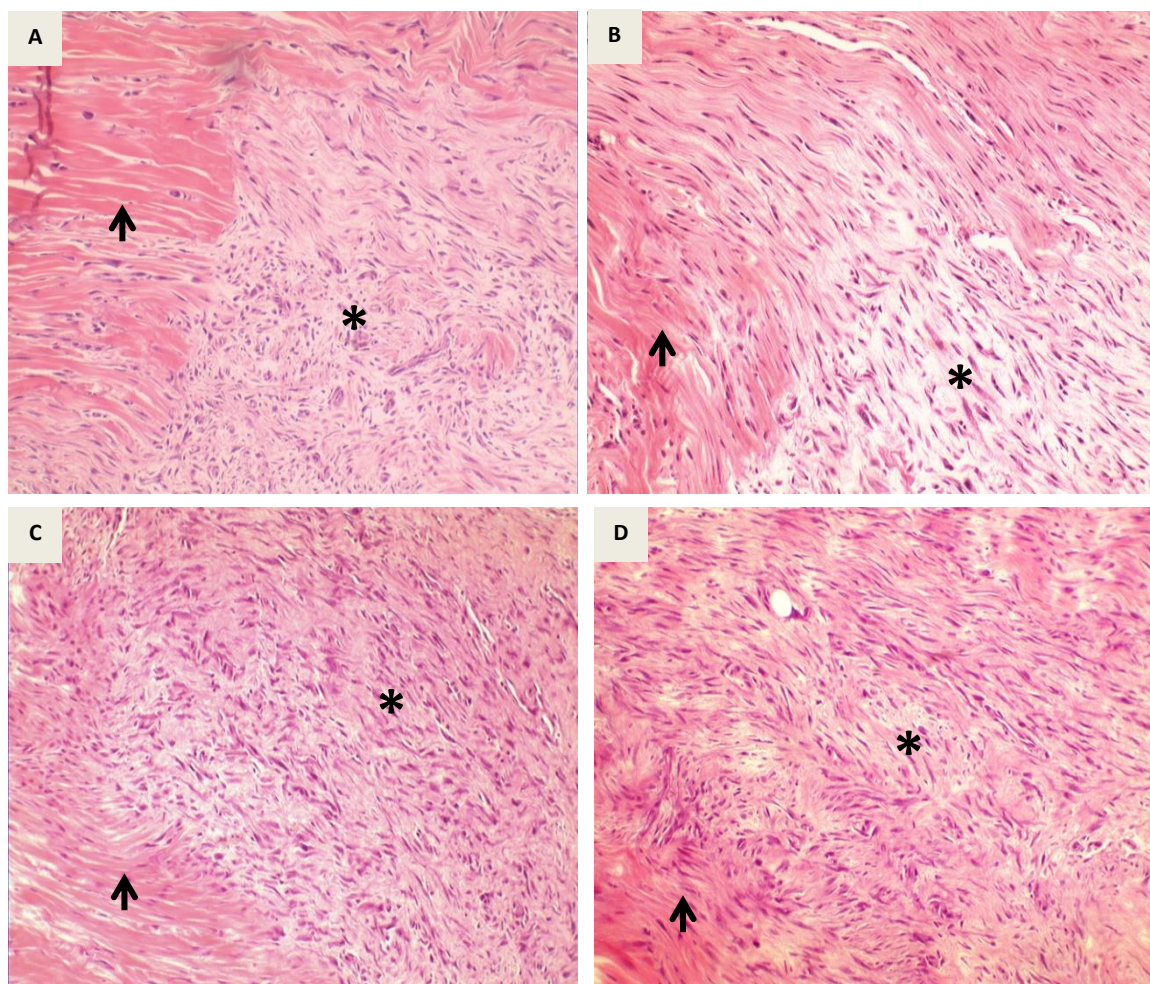
5.5.1 Evolução temporal

5.5.1.1 Sete dias de evolução

Observou-se que a fenda resultante da transecção parcial estava em pequena parte ocupada por tecido de granulação jovem, com matriz extracelular (MEC) muito edemaciada, contendo vasos sanguíneos, material fibrinóide e infiltrado inflamatório composto por neutrófilos e macrófagos. A maior parte estava preenchida por tecido de granulação frouxo com grande número de fibroblastos, dispostos em feixes desorganizados. No endotendão situado nas margens da fenda, especialmente no coto proximal, notou-se proliferação intensa de tenócitos, ovoides em sua maioria, posicionados em fileiras entre as fibras de colágeno (**Figura 12 A**).

O LE7 mostrou a fenda tomada por tecido de granulação mais maduro, com raras células inflamatórias e já apresentando fibroblastos dispostos em feixes mais organizados. Também ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 12 B**). No (LS7), resíduos do selante de fibrina foram encontrados nas bordas da fenda da tenotomia, envolvidos por macrófagos e fibroblastos. Ocorreu proliferação acentuada de fibroblastos mais maduros, com citoplasma escasso e núcleo delgados, dispostos em feixes paralelos ao grande eixo do tendão. Numerosos tenócitos ovoides foram observados no endotendão marginal (**Figura 12 C**).

Figura 12: Aspectos histológicos, sete dias de evolução.



Legenda: Área de transição entre o tendão preservado (seta) e o tecido de granulação ocupando a fenda da tenotomia parcial (*). A (Grupo controle): matriz extracelular com infiltrado inflamatório e fibroblastos sem orientação definida. B: (Grupo exercício aquático): matriz extracelular com escasso infiltrado inflamatório. Fibroblastos em feixes paralelos. .C: (Grupo selante de fibrina): Fibroblastos em feixes paralelos dispostos; matriz extracelular densa. D: (Grupo selante de fibrina associado a exercício aquático): Fibroblastos em feixes paralelos dispostos; matriz extracelular densa. H.E. 100x.

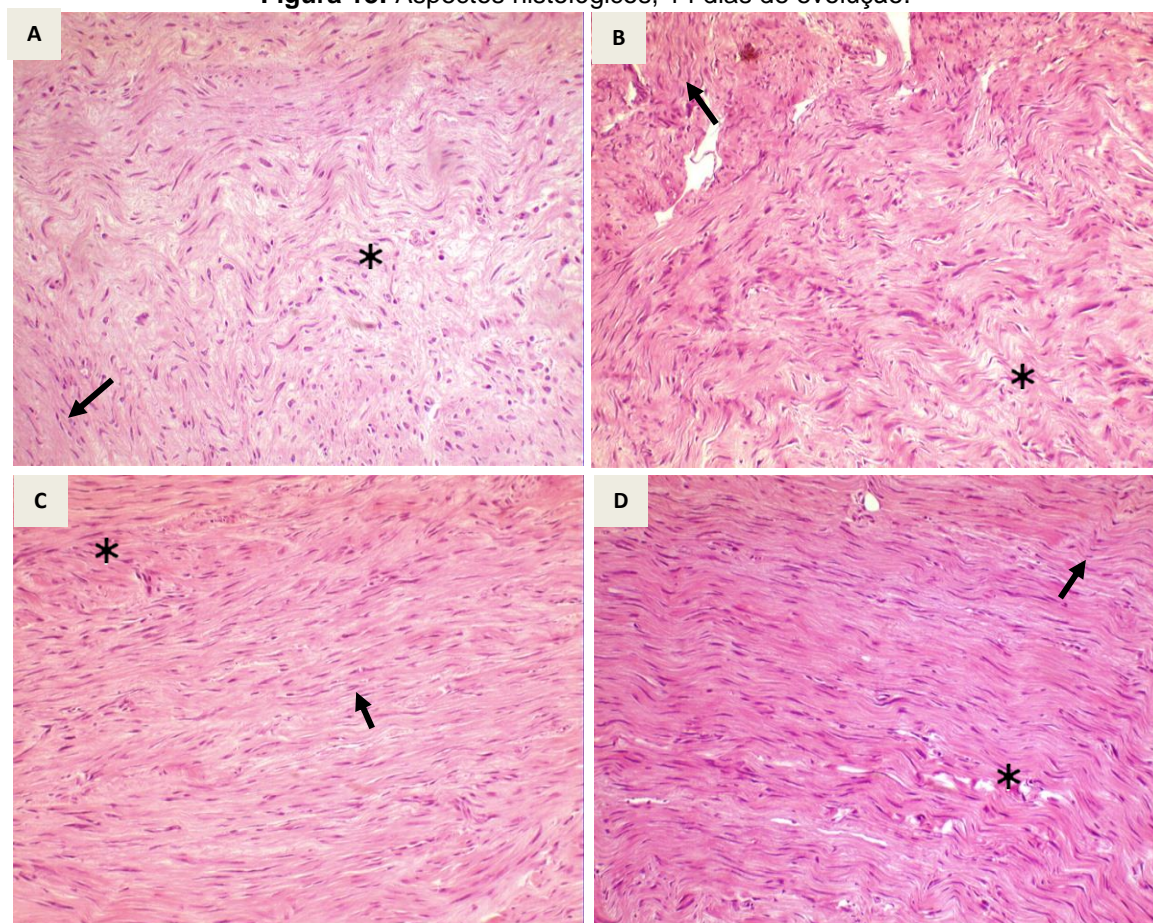
Fonte: Dados da pesquisa, 2020

O (LSE7) também mostrou detritos do selante de fibrina delimitados por macrófagos e fibroblastos. A fenda estava preenchida predominantemente por fibroblastos maduros dispostos em feixes paralelos ao grande eixo do tendão. Igualmente ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 12 D**).

5.5.1.2 Quatorze dias de evolução

Mostrou preenchimento da fenda da transecção por fibroblastos dispostos em feixes ondulados numa MEC frouxa, ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 13 A**). No (LE14), a fenda foi preenchida por fibroblastos dispostos em feixes ondulados numa MEC mais densa em comparação aos controles, ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 13 B**).

Figura 13: Aspectos histológicos, 14 dias de evolução.



Legenda: A (Grupo controle): matriz extracelular frouxa com fibroblastos ondulados. B: (Grupo exercício aquático): matriz extracelular mais densa com fibroblastos ondulados. C: (Grupo selante): Fibroblastos dispostos em feixes paralelos; matriz extracelular densa. D: (Grupo selante e exercício aquático): Fibroblastos em feixes paralelos dispostos; matriz extracelular densa. H.E., 100x.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

O (LS14) igualmente revelou proliferação fibroblástica acentuada que ocupou a fenda. Os fibroblastos se organizaram em feixes paralelos ao grande eixo do tendão, sendo a MEC densa. Ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 13 C**). No (LSE14) observou-se fenda ocupada por intensa proliferação de fibroblastos, dispostos em feixes paralelos ao grande eixo do tendão, ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 13 D**).

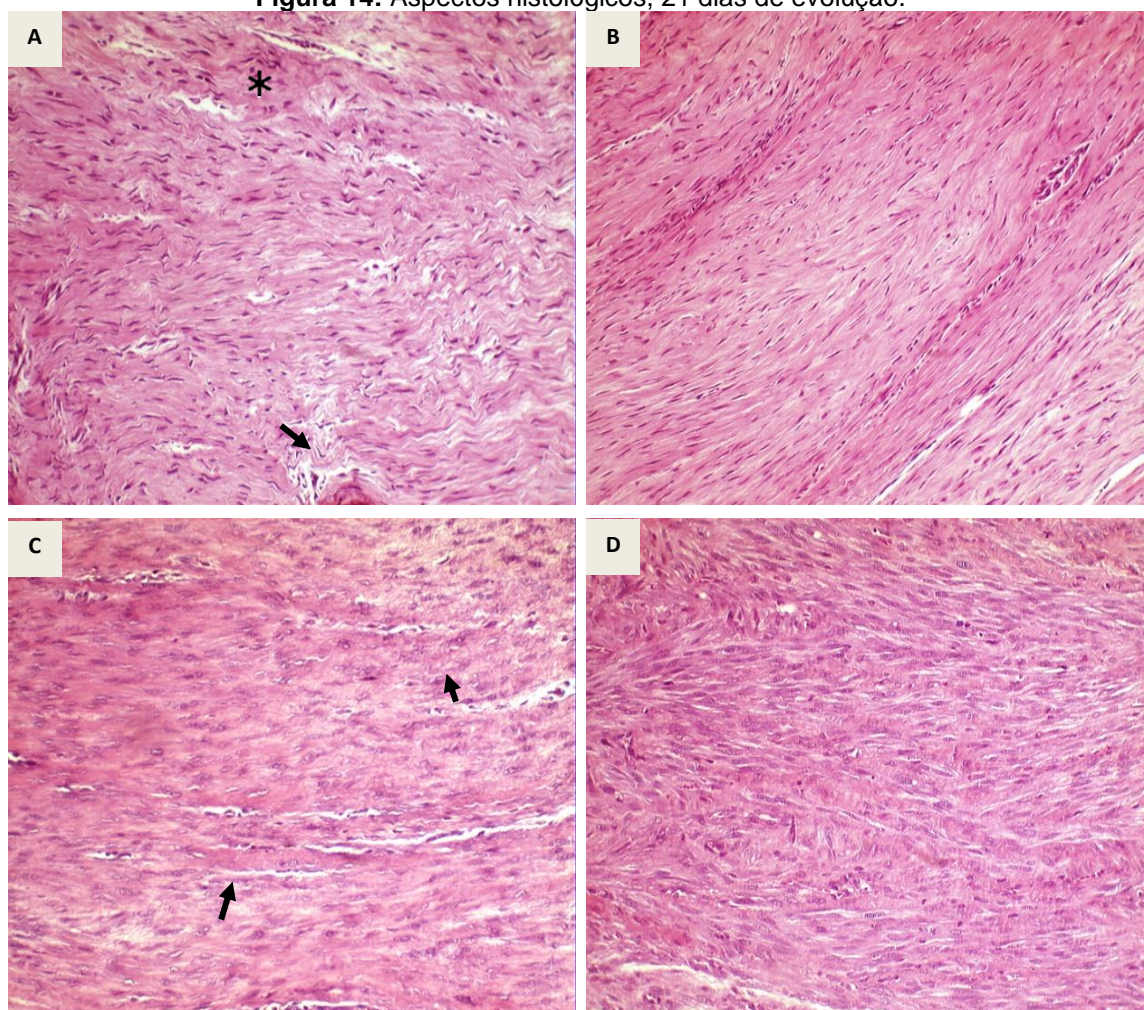
5.5.1.3 Vinte e um dias

A fenda se mostrou ocupada por intensa proliferação de fibroblastos, dispostos em feixes paralelos ao grande eixo do tendão. A MEC se apresentou pouco densa, ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão tendão marginal (**Figura 14 A**). No (LE21), a proliferação fibroblástica foi especialmente intensa, ocupando a fenda e se estendo ao epitendão, ocorreu proliferação intensa de tenócitos ovoide no endotendão marginal (**Figura 14 B**).

O (LS21) revelou proliferação fibroblástica comparável à do grupo controle nessa etapa, igualmente mostrando proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 14 C**). No (LSE21), a proliferação fibroblástica foi, comparativamente, mais acentuada do que nos demais grupos, os fibroblastos dispostos em feixes paralelos e compactos, observou-se proliferação intensa de tenócitos ovoides no endotendão marginal (**Figura 14 D**).

Nenhum dos grupos exibiu integral reorganização da estrutura do tendão no 21º dia de evolução. Os achados histológicos, no entanto, indicam que a utilização do selante de fibrina, isoladamente ou em combinação com a exercício aquático, tem efeitos benéficos no tratamento da tendinite experimental em ratos.

Figura 14: Aspectos histológicos, 21 dias de evolução.



Legenda: A (Grupo controle): fibroblastos dispostos em feixes paralelos. B: (Grupo exercício aquático): fibroblastos numerosos e dispostos em feixes paralelos e compactos. C: (Grupo selante de fibrina): fibroblastos muito abundantes organizados em feixes paralelos. D: (Grupo selante e exercício aquático): proliferação muito a intensa de fibroblastos em feixes paralelos; matriz extracelular escassa. H.E., 100x.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

5.5.2 Escore de Bonar

A **Tabela 5** apresenta a pontuação no escore histológico de Bonar para cada grupo em seu período experimental.

Tabela 5: Escore histológico de Bonar

	Morfologia celular	Celularidade	Vascularização	Substância fundamental	Escore Bonar
L 7	2	2,0	1,5	1,9	7,0 ± 0,5
LE 7	1,2	1,6	0,7	1,6	5,3 ± 0,3*
LS 7	1,2	1,8	0,7	2,0	5,8 ± 0,3*
LSE 7	1,1	1,6	1,2	2,3	6,4 ± 0,6*
L 14	1,4	1,3	2,3	2,1	7,2 ± 0,4
LE 14	1,0	1,5	1,6	2,3	6,6 ± 0,3
LS 14	0,9	1,3	1,5	2,1	5,8 ± 0,3 ^a
LSE 14	1,0	1,3	1,3	1,8	5,6 ± 0,5 ^{ab}
L 21	1,0	1,3	1,4	1,9	5,7 ± 0,3
LE 21	1,2	1,5	1,1	1,3	5,3 ± 0,4
LS 21	1,2	1,8	0,8	1,5	5,4 ± 0,5
LSE 21	1,1	1,2	0,8	1,4	4,7 ± 0,4 ^c

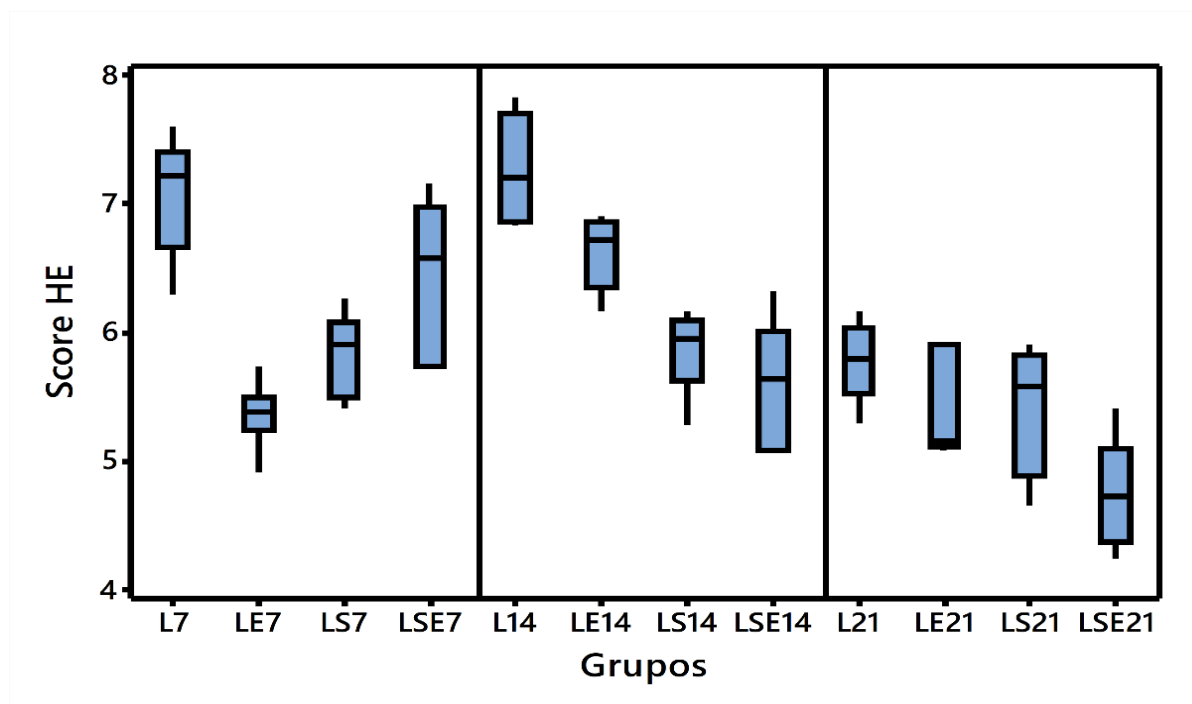
Legenda: * diferença significativa na comparação com L7; ^a diferença significativa na comparação com L14; ^b diferença significativa na comparação com LE14; ^c diferença significativa na comparação com L21.

Fonte: Dados da pesquisa, 2020

5.5.2.1 Análise Intergrupos

Os escores foram significativamente menores nos animais tratados após 7 dias de transecção parcial, LE7 ($p < 0,0001$), LS7 ($p < 0,0001$) e LSE7 ($p < 0,0001$), quando comparados ao L7. Da mesma forma, após 14 dias os grupos tratados, LS14 ($p < 0,0001$) e LSE14 ($p < 0,0001$) também apresentaram escores significativas menores comparados ao L14 no mesmo período. Ainda, neste período experimental pode ser observado que o grupo que associou selante de fibrina ao exercício aquático apresentou valores estatisticamente menores de escores quando comparado ao grupo selante de fibrina. No entanto, após 21 dias apenas o LSE21 apresentou diferença estatística menores ($p = 0,005$) comparado ao L21 e ao demais grupos tratados (**Figura 15**).

Figura 15: Comparação intergrupos para o score de H.E. dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

5.5.2.2 Análise Intragrupos

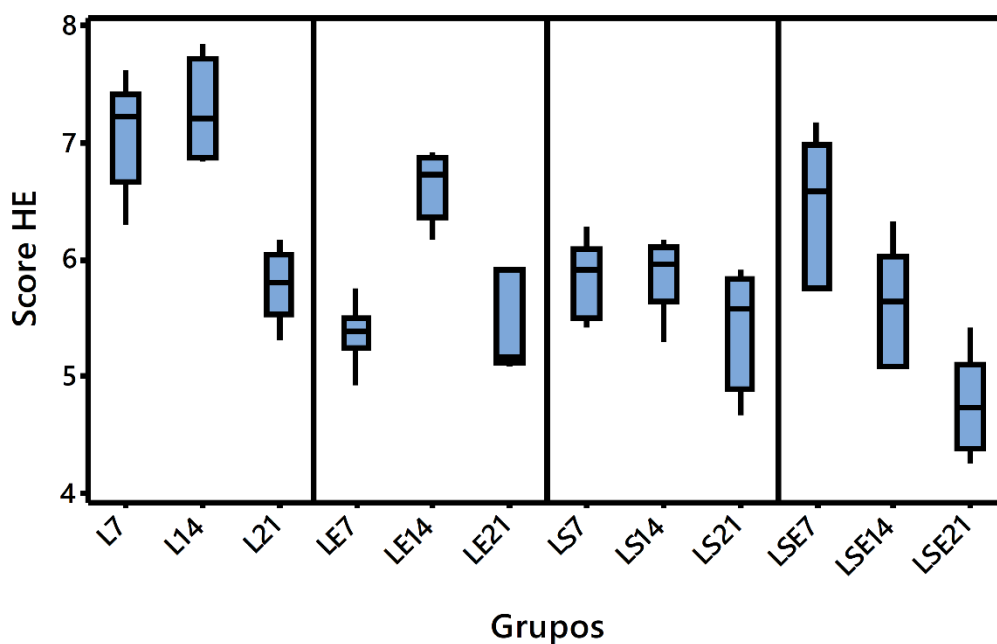
Na comparação intragrupo (**Figura 15**), o L21 apresentou diferença estatística ($p < 0,0001$) de valores de escores menores quando comparado com L7 e L14, não sendo observada diferença estatística entre L7 e L14 ($p = 0,999$).

O grupo tratado com exercício aquático apresentou diferença estatística maiores quando comparados L14 com L7 e L21 ($p < 0,0001$).

O grupo tratado somente com selante de fibrina não apresentou diferença estatística entre os tempos de tratamentos (LS7, LS14 e LS21).

Já o grupo tratado com selante de fibrina e exercício aquático apresentou diferença estatística para todos os tempos estudados (LSE7, LSE14 e LSE21).

Figura 16: Comparação intragrupos para o score de H.E. dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

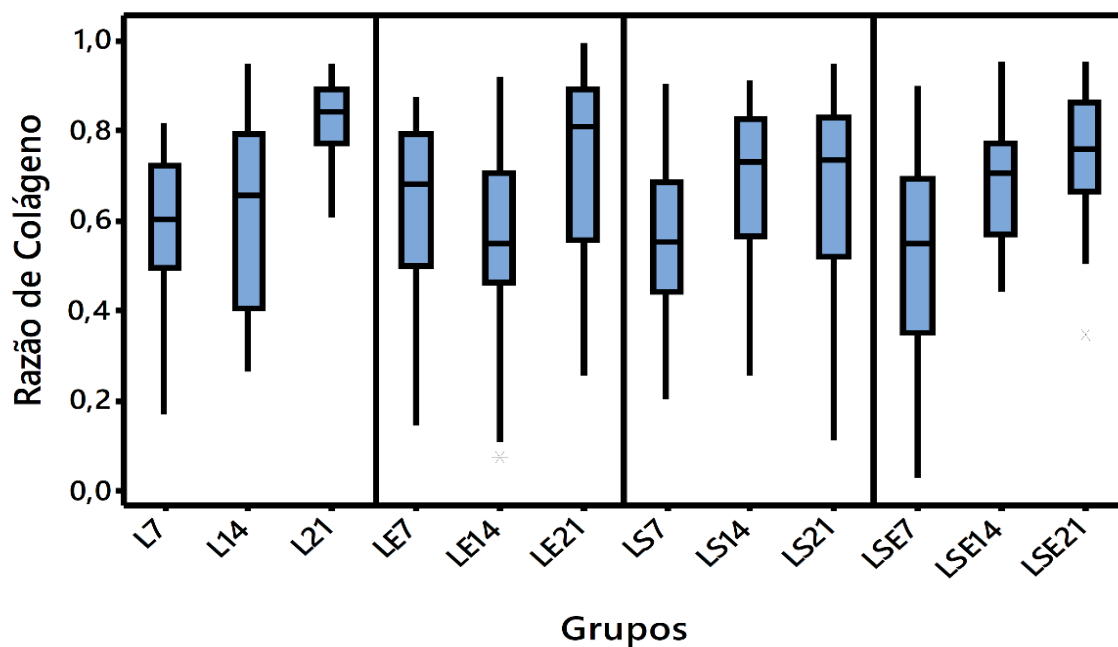
5.6 Quantificação do Colágeno

5.6.1 Coloração por Tricrômico de Masson

Os resultados da razão de colágeno observado pelo método de Tricrômico de Masson, estão apresentados na **(Figura 17)** para comparação intragrupos e **(Figura 18)** para comparação intergrupo. Na **Tabela 6**, a variação do número de imagens avaliadas (N) se dá pela quantidade e qualidade das lâminas histológicas, sem comprometer a análise estatístico.

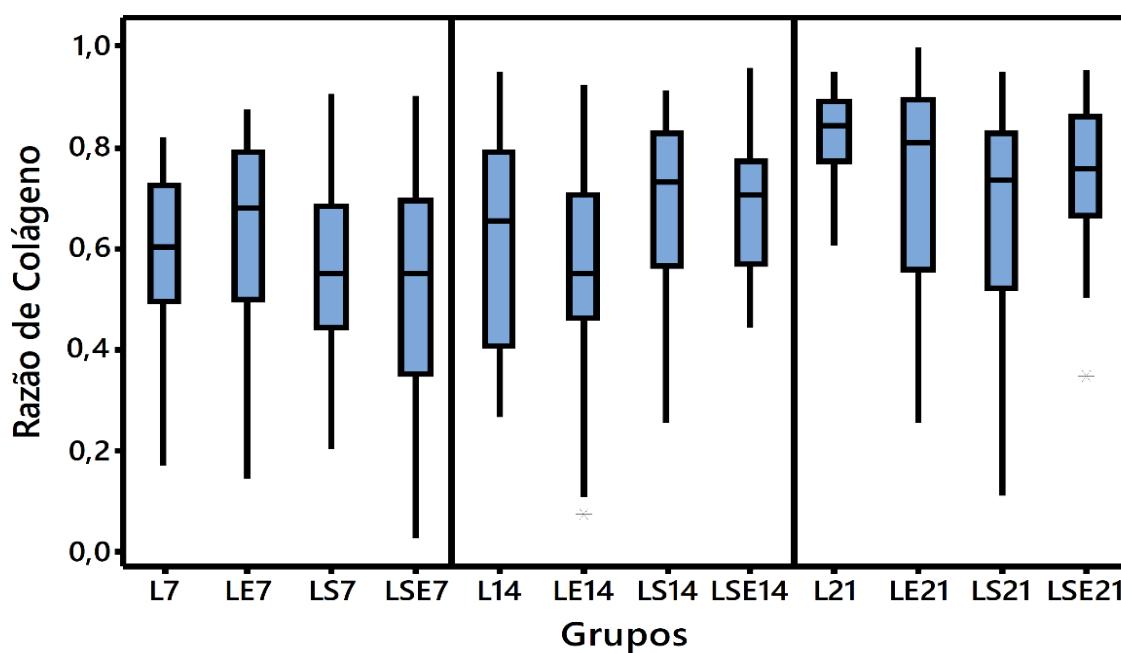
Em relação a evolução dos intragrupos **(Figura 17)**, para o grupo controle foi possível observar diferença estatística somente entre o L21 e L7 ($p < 0,000001$) e L21 e L14 ($p = 0,00007$). Da mesma forma, no grupo exercício aquático foi possível observar diferença estatística somente entre o LE21 e LE7 ($p = 0,025$) e LE21 e LE14 ($p = 0,00011$). Para o grupo selante de fibrina foi observado diferença estatística entre LS7 e LS14 ($p = 0,004$) e LS7 e LS21 ($p = 0,009$), não havendo diferença entre LS14 e LS21. Da mesma forma, no grupo exercício aquático associado à selante de fibrina foi observado diferença estatística entre LSE7 e LSE14 ($p = 0,004$) e LS7 e LS21 ($p = 0,00002$), não havendo diferença entre LS14 e LS21.

Figura 17: Comparação intragrupos para o score de Tricrômico de Masson dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Figura 18: Comparação intergrupos para o score de tricrômico de Masson dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

A comparação entre grupos (**Figura 18**) foi observada diferença estatística somente entre os LE7 e LSE7 ($p = 0,037$) em 7 dias de tratamento, LE14 e LSE14 ($p = 0,037$) em 14 dias de tratamento e L21 e LS21 ($p = 0,007$) em 21 dias de tratamento.

Tabela 6: Representação das médias de colágeno entre os grupos para o ensaio de coloração com Tricrômico de Masson

Grupo	N	Média	Desvio Padrão	P-Valor
L7	42	162,9 ^c	0,1596	0,076
L14	36	187,7 ^c	0,2042	0,025
L21	18	320,5 ^{ab}	0,08882	0,341
LE7	30	198,0	0,1921	0,046
LE14	36	156,6 ^c	0,1939	0,372
LE21	36	262,4 ^b	0,2146	<0,005
LS7	42	150,3	0,1895	0,587
LS14	36	226,1	0,1657	0,058
LS21	26	225,4	0,2073	0,145
LSE7	36	138,1 ^c	0,2289	0,517
LSE14	36	216,6	0,1305	0,254
LSE21	27	263,8 ^a	0,1422	0,180

Legenda: a≠7 b≠14 c≠21

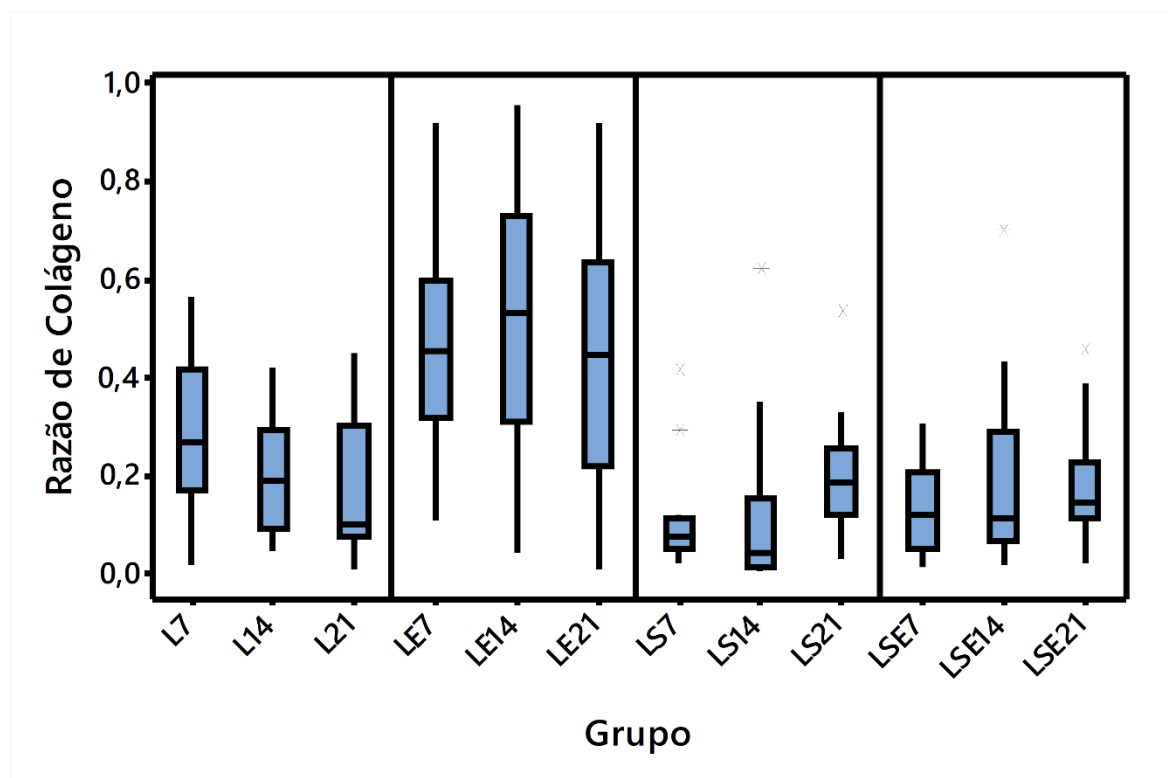
Fonte: Dados da pesquisa, 2020

5.6.2 Coloração de *Picrosirus Red*

Os resultados da razão de colágeno observado pelo método de *picrosirus red*, estão apresentados na (**Figura 19**) para comparação intragrupos, (**Figura 20**) para comparação intergrupo.

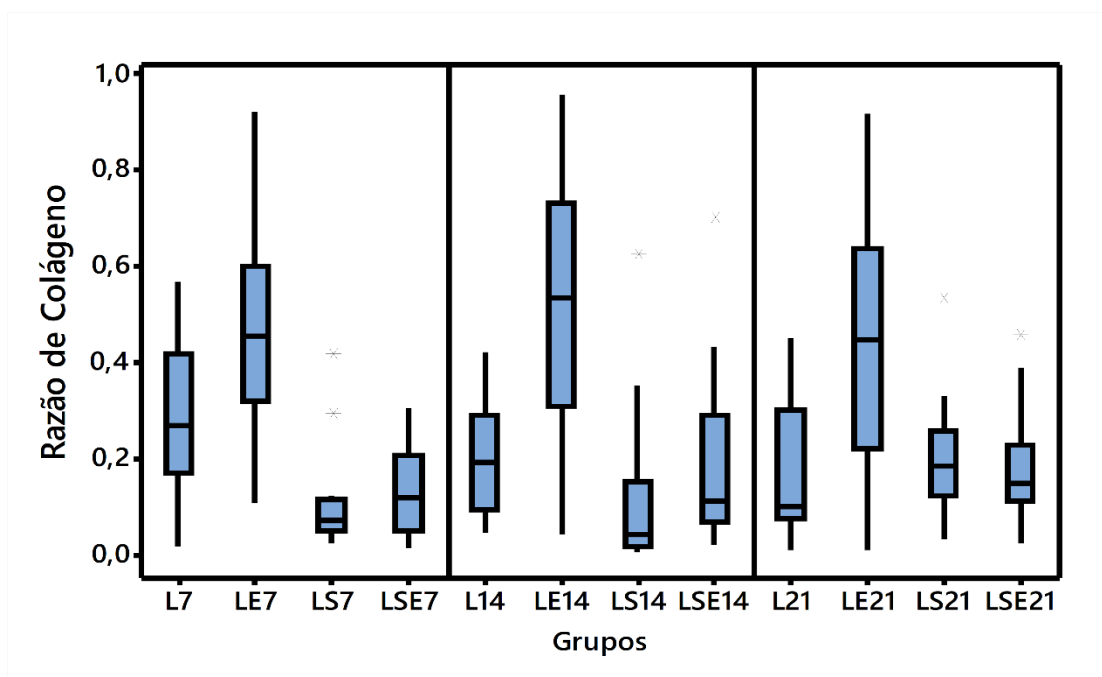
A razão de colágeno para o L7 é estatisticamente maior do que no grupo L21 ($p = 0,013$). Para os LE, não foi observada diferença estatística na quantidade de colágeno ($p > 0,4$). Nos grupos tratados com selante de fibrina, foi observada diferença estatística entre os grupos LS7 e LS21 ($p = 0,012$) e entre LS14 e LS21 ($p = 0,007$). O conteúdo de colágeno do LS21 é estatisticamente superior em comparação aos LS7 e LS14. Porém não foi observada diferença estatística entre os LS7 e LS14. Para os grupos tratados com (LSE), não foi observada diferença estatística na quantidade de colágeno, todos os grupos apresentaram ($p > 0,27$).

Figura 19: Comparação intragrupos para o Escore de Picosírus Red dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Figura 20: Comparação intergrupos dos animais submetidos ou não ao tratamento com exercício aquático, selante de fibrina e selante de fibrina associado a exercício aquático.



Fonte: Dados da pesquisa, 2020

Na comparação intergrupos (**Figura 20**) por tempo, observou-se que após 7 dias, o LE7, apresentou valor estatisticamente superior ao L7 ($p = 0,04$) na razão do colágeno. O LS7 possui valor estatisticamente inferior L7 ($p = 0,0001$); o LSE7 possui razão do colágeno estatisticamente inferior L7 ($p = 0,0005$); o LS7 apresentou razão do colágeno estatisticamente inferior ao LE7 ($p = 0,0005$) e o LSE apresentou valor estatisticamente inferior ao LE7 ($p = 0,005$).

Após 14 dias de tratamento, o LE14 apresentou valor estatisticamente superior ao L14 ($p = 0,0006$); o grupo LS14 apresentou valor estatisticamente inferior comparado ao L14 ($p = 0,009$) o LS14 possui valor estatisticamente inferior ao LE14 ($p = 0,005$); o LSE14 possui valor estatisticamente inferior ao LE14 ($p = 0,0009$) e por fim o LS14 possui o valor estatisticamente inferior ao LSE14($p = 0,04$).

Após 21 dias de tratamento, o grupo LE21 possui valor estatisticamente superior ao grupo L21 ($p = 0,0002$); o LS21 possui valor inferior ao grupo LE21 ($p = 0,01$); grupo LSE21 possui valor estatisticamente inferior comparado ao LE21 ($p = 0,003$).

6 DISCUSSÃO

Na maioria dos pacientes, especialmente indivíduos idosos, o tendão cicatrizado geralmente não recupera as propriedades mecânicas do tecido não lesionado. A resistência reduzida do tecido reparado, em comparação com o tendão nativo, resulta da integração reduzida das fibras de colágeno com uma maior proporção de colágeno tipo III para colágeno tipo I, tendo como consequência um tendão com qualidade e funcionalidade inferior à do tendão saudável. Com a finalidade de melhorar a terapia dos tendões lesionados, muitas abordagens experimentais vêm sendo investigadas, consistindo principalmente na aplicação de fatores de crescimento, isoladamente ou em combinação, células-tronco na forma nativa ou geneticamente modificada e biomateriais, isolados ou carregados de células, no local da lesão do tendão (DOCHEVA *et. al.*, 2015). Sendo assim, nosso principal objetivo foi verificar o uso do SFDVS associado ou não ao exercício aquático no reparo tendíneo em ratas em um protocolo de 21 dias.

O edema é uma resposta comum que ocorre após à lesão e pode trazer uma série de eventos indesejáveis, dentre eles, retardo do processo cicatricial. Os tratamentos para lesão tendíneas objetivam reduzir a inflamação, reduzindo o edema, visando evitar a separação dos feixes de fibras de colágenos e a deposição excessiva de tecido cicatricial (BERTOLINI *et. al.*, 2005). Em nosso estudo foi possível observar que após 7 dias da indução da lesão os grupos tratados apresentaram redução de edema estatisticamente menores quando comparados ao grupo controle. Após 7 e 14 dias, o grupo tratado com exercício aquático apresentou a maior redução do volume de edema comparada ao controle.

Gianesini *et. al.* (2016) também observaram resultados similares ao deste estudo, ao verificarem a eficácia da atividade física em ambiente aquático na redução do edema bilateral de membros inferiores (MMII), demonstrou que um protocolo de cinco sessões de exercícios físicos concebidos especificamente dentro de uma piscina, reduziu significativamente a média no volume dos MMII uma semana após o término do protocolo nas pernas direita ($p < 0,00002$) e esquerda ($p < 0,000003$). Foi também observada melhora significativa da amplitude de movimento do tornozelo e sensação de peso. Após 21 dias, do nosso experimento, observou-se que o grupo tratado apenas com SF foi o que apresentou a maior redução do edema comparado ao grupo controle.

Yu *et al.* (2018) realizaram um estudo prospectivo randomizado para testar se o selante de fibrina reduzia o edema e a dor na rinoplastia aberta sem osteotomia. Os pacientes foram divididos aleatoriamente em 1 de 2 grupos: aqueles tratados com selante de fibrina aerossolizado (grupo SF) e aqueles não tratados (grupo controle). Foi observado que o modelo utilizado SF aerossolizado reduziu significativamente não apenas a equimose e o inchaço na área periorbital, mas também o edema do dorso nasal ($p < 0,05$).

O fator mais importante para recuperar a função deslizante não é impedir a adesão do tecido adjacente, mas reduzir a fenda da cicatriz que é a quantidade de tecido fibroso (TEMPFER *et al.*, 2018). Essa redução requer traumatismo mínimo, ausência de hematoma e abscesso, além de descanso para permitir uma cicatrização ideal. Uma ruptura de adesão torna o processo inflamatório e a formação de cicatrizes agudas novamente (MCQUILLING *et al.*, 2018). O tendão regenerado com preservação da função deslizante indica uma remodelação do tecido cicatricial, mantendo arquitetura morfológica suficiente para não prejudicar sua função deslizante, portanto, é importante não romper as aderências, mas remodelar a cicatriz (ALVITI *e al.*, 2017).

Antunes *et al.* (2012) demonstraram, em um modelo experimental de trauma de tendão de calcâneo direito, que 2 a 4 séries de 5 saltos em meio aquático diariamente, com intervalo de 24 horas entre as aplicações, foram ligeiramente eficientes na redução do edema e da nocicepção. Contrariando estes achados, no estudo de Santana *et al.* (2018), um protocolo de 21 dias utilizando exercícios aquáticos associados à sericina não foi eficiente na melhora das propriedades musculares, embora a aplicação do exercício físico tenha sido eficiente na manutenção do conjuntivo intramuscular, e no não agravamento dos efeitos deletérios consequentes da lesão nervosa periférica.

Durante a cicatrização do tendão, a celularidade pode aumentar em seis ou mais vezes e isso é importante pelo fato de fibroblastos terem função principal na deposição e remodelamento da matriz extracelular (BARBATO *et al.*, 2018). Na avaliação microscópica do processo de cicatrização tendínea com HE, observamos que a proliferação e a organização de fibroblastos na área cicatricial foi mais evidente com a aplicação do selante, isoladamente ou em associação com exercício aquático. Sendo mais intensa após 21 dias da aplicação do selante. Os achados histológicos,

no entanto, indicam que a utilização do SFDVS, sozinho ou em combinação com exercício aquático, têm efeitos benéficos no tratamento de lesão tendínea.

Nesse sentido, o efeito do selante de fibrina derivado do veneno de cobra associado ou não a exercício aquático, relatado neste trabalho, pode potencialmente reduzir o volume de edema e acelerar o processo de cicatrização de lesão tendínea.

Os selantes de fibrina são preparados a partir de plasma sanguíneo e utilizados como um adesivo biodegradável para o tecido (BISCOLA *et. al.*, 2017). O selante de fibrina derivado do veneno da serpente permite o uso de fibrinogênio heterólogo e, além de empregar uma enzima do tipo trombina do veneno de cobra que é mais potente que a trombina bovina (IATECOLA *et. al.*, 2013). No estudo de De Barros *et al.*, (2016) os autores analisaram o reparo da cartilagem, utilizando o selante de fibrina desenvolvido do veneno da cascavel como andaime, tendo como resultados uma aplicabilidade excelente. O gel não desencadeou efeitos indesejáveis, como inflamação, e permitiu um processo normal de reparo corroborado com os dados aqui apresentados. Um dos efeitos positivos do novo selante de fibrina testado no presente estudo é sua biocompatibilidade (ORSI *et. al.*, 2017). O selante de fibrina derivado do veneno de serpentes possui uma configuração tridimensional de rede de fibrina que atua como um suporte adequado para a adesão e proliferação celular, estimulando assim a cicatrização (FERRARO *et. al.*, 2005; MACHADO *et. al.*, 2015; BISCOLA *et. al.*, 2017; FERREIRA *et. al.*, 2015).

Esse selante interage com a fração enzimática do veneno de serpentes, liberando fibrina monomérica na presença de cálcio e fator XIII, que é convertido em polímero com propriedades adesivas e selantes (BUCHAIM *et. al.*, 2019). O estudo de Vidigal de Castro *et. al.*, (2016) utilizou ratos Lewis fêmeas para demonstrar que o selante de fibrina obtido a partir do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, bem como o selante de fibrina comercial Tissucol, resultaram em neuroproteção de motoneurônios axotomizados proximalmente e recuperação motora indicando um desempenho regenerativo semelhante de ambos os selantes biológicos empregados.

A Análise histopatológica escores de Bonar mostra em nosso estudo que o tratamento com SFDVS após 21 dias de tratamento, apresentou, valores de escores estatisticamente menores quando comparados aos demais grupos. Dessa forma o SFDVS quanto ao exercício aquático influenciou de forma positiva a reparação do tendão calcâneo.

O exercício físico regular aumenta a atividade de manutenção celular, incluindo o complexo de proteassoma, Lon protease, autofagia, mitofagia e as enzimas de reparo do DNA da atividade envolvidas nos danos mediados pelas espécies reativas de oxigênio (RADAK *et. al.*, 2019; SOARES *et. al.*, 2019; DEBASTIAN *et. al.*, 2019). Os tendões têm uma boa resposta ao exercício aeróbico, como nadar e correr (BARBATO *et. al.*, 2018). No exercício, as células tendíneas respondem produzindo fatores de crescimento, existindo um suporte para um aumento induzido por carga, na síntese de colágeno tendinoso, sendo abordado em experimentos em animais, observa-se aumentos na expressão de IGF-I, TGF- β 1 e colágeno (SVENSSON *et. al.*, 2016).

Terapia usando exercícios aquáticos tem um efeito positivo na função e na dor, é benéfico para manter a resistência física (VASILIADIS *et. al.*, 2019). Corroborando com nossos estudos Sheikhani-shahin *et. al.*, (2019) analisaram o efeito de exercícios aquáticos em lesões nos tendões de ratos, relatando um aumento significativo da celularidade no grupo da atividade aquática, em comparação com o grupo de controle.

Na análise de picosirius Red, alguns cortes corados não puderam ser contabilizados, em função da na qualidade dos cortes histológicos e coloração, situação semelhante nos estudos de Dietrich (2012). Observou-se que após 7º dia de lesão o grupo controle L7 dias apresentou maior conteúdo de colágeno do que 21º.

A quantificação do colágeno Tricrômico de Masson, demonstrou aumento na concentração de colágeno para o grupo tratado com selante associado com exercício aquático no período avaliado de 21 dias. Sendo que o colágeno é o principal constituinte dos tendões, principalmente o colágeno tipo I (cerca de 60 a 90%), estando também diretamente relacionado à recuperação da estrutura e das propriedades biomecânicas dos tendões durante o processo de reparo (SVENSSON *et. al.*, 2016; FRAUZ *et. al.*, 2019).

O selante associado ao exercício aquático aplicado no tendão calcâneo lesionado no estudo aqui apresentado ajudou na cicatrização do tendão e aumentou a produção de colágeno. Sendo alta expressão do colágeno essencial para obter uma cicatrização mais rápida dos tendões (GISSI *et. al.*, 2020).

7 CONCLUSÃO

No presente estudo, tratamentos cirúrgicos utilizando selante de fibrina, associado ou não a uma terapêutica conservadora, o exercício aquático para recuperação de lesão de tendão calcâneo foi avaliado em modelo animal.

Foi demonstrado que a associação do selante de fibrina ao exercício aquático na recuperação de transecção parcial foi uma modalidade terapêutica eficaz na melhora do edema advindo do processo inflamatório.

SFDVS somado ao exercício aquático influenciou de forma positiva na reparação do tendão calcâneo. A associação do SF com exercício aquático tem uma melhor eficácia na redução do volume de edema, bem como foi possível observar aumento da razão do colágeno e diminuição do Escore de Bonar, acelerando o processo de reparo. Essa técnica se apresentou como um tratamento promissor para futuras aplicações clínicas.

REFERÊNCIAS

- ADABBO, M. **Efeitos do laser de baixa intensidade e do exercício físico aeróbio sobre a regeneração do músculo tibial anterior de ratos**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Carlos, 2012.
- ALSOUSOU, J.; KEENE, D. J.; HULLEY, P. A.; HARRISON, P.; WAGLAND, S.; BYRNE, C.; WILLETT, K. Platelet rich plasma in Achilles tendon healing 2 (PATH-2) trial: protocol for a multicentre, participant and assessor-blinded, parallel-group randomised clinical trial comparing platelet-rich plasma (PRP) injection versus placebo injection for Achilles tendon rupture. **BMJ Open**, **BMJ open**, v. 7, n. 11, p. e018135, 2017.
- ALVITI, F.; GURZÌ, M.; SANTILLI, V.; PAOLONI, M.; PADUA, R.; BERNETTI, A.; MANGONE, M. Achilles tendon open surgical treatment with platelet-rich fibrin matrix augmentation: biomechanical evaluation. **The Journal of Foot and Ankle Surgery**, v. 56, n. 3, p. 581-585, 2017.
- ANTUNES, J.S. et al. Efeito do exercício resistido na redução do edema, nocicepção e regeneração nervosa em um modelo de compressão do nervo isquiático. **Sci Med**, v. 26, n. 3, 23711, 2016.
- ANTUNES, J.S. et al. Exercício resistido em meio aquático para ratos Wistar submetidos a trauma em tendão: avaliação da nocicepção e edema. **Rev. dor**, v. 13, n. 1, p. 55-58, 2012.
- ARTHUR, K. **Efeito combinado da aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e selante de fibrina, no processo de reparo de tendão calcâneo de ratos**. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e Estrutural) – Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2016.
- ASSIS, L.; TIM, C. MAGRI, A.; et al. A imunoexpressão da interleucina-10 e do colágeno tipo II é modulada por fotobiomodulação associada a exercícios aeróbicos e aquáticos em um modelo experimental de osteoartrite. **Lasers Med Sci** 33, 1875-1882 (2018).
- BARBATO, K. B. G.; RAPOSO, C.; DIAS, H.; PAIVA, R.; DA COSTA, J.; RODRIGUEZ, L.; CARVALHO, J. Benefits of the Combined Use of NSAID and Early Exercise on Tendon Healing in a Murine Model. **Open Journal of Animal Sciences**, v. 8, n. 4, p. 357-369, 2018.
- BARBOSA, M.D.; STIPP, A.C.; PASSANEZI, E.; GREGHI, S.L.; Adesivo de fibrina derivado do veneno de cobra em cirurgia periodontal: análise histológica. **J Appl Oral Sci**. 2008.
- BARFOD, K.W. et al. Nonoperative dynamic treatment of acute Achilles tendon rupture: the influence of early weight-bearing on clinical outcome: a blinded, randomized controlled trial. **J Bone Joint Surg Am**, v. 96, p. 1497-1503, 2014.
- BERTOLINI, G. R. F.; ALBUQUERQUE, C. E.; MENON, T.; DASSOLER, K. P. Efeitos do ultra-som terapêutico em edema traumático agudo em patas de ratos. **Revista UNINGÁ**, n. 3, p. 23-31, jan./mar. 2005.

BERTOLINI, G.R.F. et al. Comparação do ultrassom pulsado e contínuo no reparo tendíneo de ratos. **Fisioter Pesq.**, v. 19, n. 3, p. 242-247, 2012.

BERTOLLINI, G.R.; NASCIMENTO, C.M.; ARTIFON, E.L.; CUNHA, D.M.; MEIRELES, A. Swimming training and functional assessment of sciatic nociception in rats. **Rev Bras Reumatol.**, 2011.

BISCOLA, N. P.; CARTAROZZI, L. P.; ULIAN-BENITEZ, S.; BARBIZAN, R.; CASTRO, M. V.; SPEJO, A. B.; OLIVEIRA, A. L. R. Multiple uses of fibrin sealant for nervous system treatment following injury and disease. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 13, 2017.

BRODIE M. et al. Biomechanical properties of Achilles tendon repair augmented with a bioadhesive-coated scaffold. **Biomed Mater.**, v. 6, n. 1, 015014, 2011.

BUCHAIM, D. V.; CASSARO, C. V.; SHINDO, J. V. T. C.; COLETTA, B. B. D.; POMINI, K. T.; ROSSO, M. P. D. O.; BUCHAIM, R. L.. Unique heterologous fibrin biopolymer with hemostatic, adhesive, sealant, scaffold and drug delivery properties: a systematic review. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, 2019.

BUCHAIM, D.V. et al. The new heterologous fibrin sealant in combination with low-level laser therapy (LLLT) in the repair of the buccal branch of the facial nerve. **Lasers Med Sci.**, 2016;

CAROMANO, F. A.; THEMUDO FILHO, M. R.; CANDELORO, J.M. Efeitos fisiológicos da imersão e do exercício na água. **Fisioterapia Brasil** - volume 4 - número 1 - janeiro / fevereiro de 2003.

CARVALHO, A. A.M. **Análise das alterações de tendões calcaneares e dos efeitos da dieta hiperlipídica associada ao exercício natatório.** Dissertação (Mestrado em Ciências Biomédicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2015.

CASSARO, C. V. **Selante heterólogo de fibrina como arcabouço para células tronco mesenquimais associados ao fosfato de cálcio e aplicados em defeito crítico de fêmures de ratos.** Dissertação de Mestrado, Universidade Estadual Paulista. Botucatu, 2018.

CASTRO, M. V. **Estudo Comparativo do Emprego de Selante de Fibrina Comercial e Derivado do Veneno de Cascavel para Reimplante de Raízes Ventrais Medulares após Avulsão.** Campinas, 2015.

CASTRO, T. dos S. N. **Efeitos do laser 660 nm na integração do autoenxerto cutâneo em ratos.** Tese de Dissertação. Programa de Pós Graduação em Engenharia Biomédica da Universidade Brasil. São Paulo, 2019.

CAVSSAN, N.R.V.; SANTOS, L.D. **Expressão Diferencial de Proteínas no Exsudato Inflamatório de Úlceras Venosas Crônicas Antes e Após o Tratamento com Selante Heterólogo de Fibrina: Uma Coorte Prospectiva.** Tese de Doutorado da Universidade Estadual Paulista, SP, Botucatu – 2020.

CÉSAR DE C. N. **Estudo histopatológico e biomecânico da tendinopatia induzida por injeção seriada de colagenase: novo modelo experimental no**

tendão de calcâneo de coelhos. Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de São Paulo. São Paulo, 2017.

COSTA, G. M.; ARAUJO, S. L.; JÚNIOR, F. A. F. X.; MORAIS, G. B. de; SILVEIRA J. A. de M.; VIANA, D. de A.; EVANGELISTA, J. S. A. M. Técnicas de tricromo de picrosirius red e masson como ferramentas para detecção de fibras de colágeno na pele de cães com dermatopatologias endócrinas. **Revista Ciências animais.** bras. vol.20 Goiânia 2019 Epub 24 out 2019.

CRESTE, C.F.Z. **Avaliação do uso do selante de fibrina derivado do veneno de serpente como arcabouço biológico de células tronco mesenquimais na regeneração óssea do fêmur de ratos.** Dissertação (Mestrado em Doenças Tropicais) - Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista Júlio de Mesquita Filho, Botucatu - SP, 2015.

DE BARROS, C. N.; MILUZZI YAMADA, A. L.; JUNIOR, R. S. F.; BARRAVIERA, B.; HUSSNI, C.; A. DE SOUZA, J. B.; GARCIA ALVES, A. L. A new heterologous fibrin sealant as a scaffold to cartilage repair—Experimental study and preliminary results. **Experimental Biology and Medicine**, v. 241, n. 13, p. 1410-1415, 2016.

DE OLIVEIRA A.R; DA SILVA F.S.; BORTOLIN R.H.; MARQUES DE D.S, RAMOS G.V.; MARQUETI R.C. Effect of photobiomodulation and exercise on early remodeling of the Achilles tendon in streptozotocin-induced diabetic rats. **PloS one**, v. 14, n. 2, 2019.

DEBASTIANI, J. C.; SANTANA, A. J.; RIBEIRO, L. D. F. C.; BRANCALHÃO, R. M. C.; BERTOLINI, G. R. F. Sericin silk protein in peripheral nervous repair associated with the physical exercise of swimming in Wistar rats. **Neurological research**, v. 41, n. 4, p. 326-334, 2019.

DELGADO, C.A.; DELGADO, S.J.G.N. **A prática da Hidroginástica.** 2ª ed. Rio de Janeiro: Sprint, 2004.

DIETRICH, F. **Comparação do efeito do plasma rico em plaquetas e fibrina rica em plaquetas no reparo do tendão de Aquiles em ratos.** Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre - RS, 2012.

DIMITROV, S.; HULTENGA, E.; HONGA, S. Inflammation and exercise: Inhibition of monocytic intracellular TNF production by acute exercise via β 2-adrenergic activation. **Bran, behavior, and Immunity**, v.61, p. 60 – 68, 2017.

DOCHEVA, D.; MÜLLER, S. A.; MAJEWSKI, M.; EVANS, C. H. Biologics for tendon repair. **Advanced drug delivery reviews**, v. 84, p. 222-239, 2015.

DUEK, J. R.; RIQUETTO, M. L.; JESUS, D. C.; SABONGI NETO, J. J.; BARBO, M. L. P.; DUEK, E. A. D. R.; MOTTA, A. C. Membrana de PLDLA-TMC como protetor na regeneração do tendão calcâneo: Estudo in vivo em coelhos. **Polímeros**, São Carlos, v. 24, n. 3, p. 360-366, June 2014.

FACCI, L. M.; MARQUETTI, R.; COELHO, K. C. Fisioterapia aquática no tratamento da osteoartrite de joelho: série de casos. **Fisioter. Mov.**, 2007.

FARCIC, T. S.; DE LIMA, R. M. C. B.; MACHADO, A. F. P.; BALDAN, C. S.; VILLICEV, C. M.; JUNIOR, I. E.; MASSON, I. F. B Aplicação do ultrassom

terapêutico no reparo tecidual do sistema musculoesquelético. **Arquivos Brasileiros de Ciências da saúde**, v. 37, n. 3, 2012.

FERRARO, G. C.; MORAES, J. R. E.; PEREIRA, G. T.; MORAES, F. R.; BUENO DE CAMARGO, M. H. Clinical and morphological evaluation of snake venom derived fibrin glue on the tendon healing in dogs. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 11, n. 4, p. 433-446, 2005.

FERREIRA, J.R. Selante de fibrina heterólogo derivado do veneno de cobra: do banco ao leito - uma visão geral. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, 2017.

FERREIRA, R. S.; DE BARROS, L. C.; ABBADE, L. P. F.; BARRAVIERA, S. R. C. S.; SILVARES, M. R. C.; DE PONTES, L. G.; BARRAVIERA, B. Heterologous fibrin sealant derived from snake venom: from bench to bedside—an overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 21, 2017.

Fearon A, Dahlstrom JE, Twin J, Cook J, Scott A. The Bonar score revisited: Region of evaluation significantly influences the standardized assessment of tendon degeneration. **J Sci Med Sport**. 2014;17(4):346-50.

FRASSON, N.F.V.; TACIRO, C.; PARIZATTO, N.A. Análise nanoestrutural da ação do ultrassom terapêutico sobre o processo de regeneração do tendão de ratos. **Fisioterapia Pesquisa**, v.16, n.3, p.198-204, 2009.

FRAUZ, K. *et. al.* Transected Tendon Treated with a New Fibrin Sealant Alone or Associated with Adipose-Derived Stem Cells. **Cells**, v. 8, n. 56, 2019.

FRAUZ, K.; TEODORO, L. F. R.; CARNEIRO, G. D.; CRISTINA DA VEIGA, F.; LOPES FERRUCCI, D.; LUIS BOMBEIRO, A.; SEABRA FERREIRA, R. Transected Tendon Treated with a New Fibrin Sealant Alone or Associated with Adipose-Derived Stem Cells. **Cells**, v. 8, n. 1, p. 56, 2019.

GABLER, C. A. R. O. L. I. N.; GIERSCHNER, S.; TISCHER, T.; BADER, R. A. I. N. E. R. Comparison of different suture techniques for Achilles tendon repair in rat model using collagen scaffolds. **Acta of bioengineering and biomechanics**, v. 20, n. 2, 2018.

GASPAROTTO, V. P. O. **Avaliação da viabilidade do selante de fibrina derivado de veneno de serpente como arcabouço biológico para células-tronco mesenquimais de medula óssea de ratos**. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista Julio de Mesquita Filho, Faculdade de Medicina de Botucatu. São Paulo, Botucatu – 2012.

GIANCAMILLO, D. *et al.* The analysis of different scaffolds and the benefit of fibrin glue for tendon tissue engineering at different culture times. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 31, v. 4 (supl. 1), p. 67-73, 2017.

GIANESINI, S. *et al.* A specifically designed aquatic exercise protocol to reduce chronic lower limb edema. **Phlebology: J Venous Dis**, v. 32, n. 9, p. 594-600, 2016.

GISSI, C.; RADEGHIERI, A.; ANTONETTI LAMORGESE PASSERI, C.; GALLORINI, M.; CALCIANO, L.; OLIVA, F.; MAFFULLI, N. Extracellular vesicles from rat-bone-marrow mesenchymal stromal/stem cells improve tendon repair in rat Achilles tendon

injury model in dose-dependent manner: A pilot study. **Plos one**, v. 15, n. 3, p. e0229914, 2020.

GOMES, C.A. F. de P. et al. Effects of low-level laser therapy on the modulation of tissue temperature and hyperalgesia following a partial Achilles tendon injury in rats. **J Cosmetic Laser Ther**, v. 19, n. 7, p. 391-396, 2017.

GONÇALVES, A.L.; LUCIANO, E. Respostas inflamatórias em ratos Wistar submetidos à atividade física. **Rev. Bras. Ativ. Fís.**, v. 4, n. 1, p. 39-46, 1999.

GREGUOL, M. **Natação adaptada: em busca do movimento com autonomia**. Barueri: Manole, 2010.

GRINSEL, D.; KEATING, C.P. Peripheral nerve reconstruction after injury: a review of clinical and experimental therapies. **BioMed Res Int**, v. 2014, 698256, 2014.

HOHENDORFF, B.; SIEPEN, W.; STAUB, L. Treatment of acute Achilles tendon rupture: fibrin glue versus fibrin glue augmented with the plantaris longus tendon. **J Foot Ankle Surg**, v. 48, n. 4, p. 439-446, jul./ago., 2009.

HOLM, C.; KJAER, M.; ELIASSON, P. Achilles tendon rupture—treatment and complications: A systematic review. **Scandinavian journal of medicine & science in sports**, v. 25, n. 1, p. e1-e10, 2015.

HOLM, C; KJAER, M; ELIASSON, P. Achilles tendon rupture – treatment and complications: A systematic Review. **Scand J Med Sci Sports**, 2014.

HSU, A.R.; HOLMES, G.B. Preliminary treatment of Achilles tendinopathy using low-intensity pulsed ultrasound. **Foot Ankle Spec**, v. 9, n. 1, p. 52-57, 2016.

IATECOLA, A.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA, R.S. DOS SANTOS, G.R.; NEVES, J.I.; DA CUNHA, M.R. Use of a new fibrin sealant and laser irradiation in the repair of skull defects in rats. **Brazilian Dental Journal**, v.24, n.5, p.456-61, 2013.

KARVAT, J.; MEIRELES, A.; ROCHA, B. P.; ROSA, C. T.; SILVA, L. I.; BERTOLINI, G. R. F. Efeitos das Correntes diadinâmicas de Bernard sobre a nociceptividade e edema no trauma tendíneo de ratos. **Fisioterapia em Movimento**, v. 26, n. 3, p. 617-622, 2013.

KARVAT, J.; ANTUNES, J. S.; BERNARDINO, G. R.; KAKIHATA, C. M. M.; BERTOLINI, G. R. F. Effect of low-level laser and neural mobilization on nociceptive threshold in experimental sciatica. **Revista Dor**, v. 15, n. 3, p. 207-210, 2014.

KETLEN, A. **Efeito combinado da aplicação de células-tronco mesenquimais derivadas de tecido adiposo e selante de fibrina, no processo de reparo de tendão calcâneo de ratos**. Dissertação de Mestrado em Biologia Celular e Estrutural – Universidade Estadual de Campinas. Campinas – 2016.

KNOBE, M. et al. Is percutaneous suturing superior to open fibrin gluing in acute Achilles tendon rupture? **Int Orthop**, v. 39, n. 3, p. 535-542, 2014.

KUNDURACILAR, Z.; SAHIN, H. G.; SONMEZER, E.; SOZAY, S. The effects of two different water exercise trainings on pain, functional status and balance in patients with knee osteoarthritis. **Complementary therapies in clinical practice**, v. 31, p. 374-378, 2018.

- KUPHAL, K.E.; FIBUCH, E.E.; TAYLOR, B.K. Extended swimming exercise reduces inflammatory and peripheral neuropathic pain in rodents. **J Pain**, v. 8, n. 12, p. 989-997, 2007.
- LANA, A. C.; PAULINO, C. A.; GONCALVES, I. D. Efeitos dos exercícios físicos sobre o edema inflamatório agudo em ratos Wistar. **Rev Bras Med Esporte**, v. 14, n. 1, p. 33-37, Feb. 2008.
- LAZARONI, P.S.O.; BAUMFELD, T.S.; MAGALHÃES, J.M.B.; LOPES, F.A.S.; AMARAL, G.M.; BAUMFELD, D.S. Resultados funcionais isocinéticos do reparo aberto e percutâneo do tendão de Aquiles. **Sci J Foot Ankle**, v.12, n.1, p.55-60, 2018.
- LEE, S. Y.; KWON, B.; LEE, K.; SON, Y. H.; CHUNG, S. G. Therapeutic mechanisms of human adipose-derived mesenchymal stem cells in a rat tendon injury model. **The American journal of sports medicine**, v. 45, n. 6, p. 1429-1439, 2017.
- LIMA, P. R. **Biopolímero de Fibrina como arcabouço biológico para células-tronco mesenquimais como potencial produtor osteogênico**. Tese de Doutorado da Faculdade de Medicina, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. São Paulo, Botucatu, 2019.
- LUI, P. P. Y. Histopathological changes in tendinopathy—potential roles of BMPs? **Rheumatology**, v. 52, n. 12, p. 2116-2126, 2013.
- MACHADO, E. G.; ISSA, J. P. M.; DE FIGUEIREDO, F. A. T.; DOS SANTOS, G. R.; GALDEANO, E. A.; ALVES, M. C.; DA CUNHA, M. R. A new heterologous fibrin sealant as scaffold to recombinant human bone morphogenetic protein-2 (rhBMP-2) and natural latex proteins for the repair of tibial bone defects. **Acta histochemica**, v. 117, n. 3, p. 288-296, 2015.
- MALANOTTE, J.A. et al. Salto em meio aquático após compressão de nervo isquiático: avaliação nociceptiva e características morfológicas do músculo sóleo de ratos Wistar. **Einstein**, v. 15, n. 1, p. 77-84, 2017.
- MCINTYRE, D. Aquatic Therapy and Pain in the Rehabilitation Patient. In: *Comprehensive Pain Management in the Rehabilitation Patient*. **Springer, Cham**, p. 347-355, 2017.
- MCQUILLING, J. P.; SANDERS, M.; POLAND, L.; BASADONNA, G.; WALDROP, N. E.; MOWRY, K. C. Dehydrated Amnion/Chorion Improves Achilles Tendon Repair in a Diabetic Animal Model. **Wounds: A Compendium of Clinical Research and Practice**, v. 31, n. 1, p. 19-25, 2018.
- MOREIRA, F. D.; JAMBEIRO, J.E.S.; CORDEIRO NETO, A.T. PEREIRA NETO, V. Reparo percutâneo das rupturas agudas do tendão calcâneo pela técnica de Dresden: resultados preliminares. **Rev ABTPé**, v.10, v.2, p.55-9; 2016.
- MUÑOZ, A, et al. O uso da esteira d'água para a reabilitação de lesões musculoesqueléticas no cavalo esportivo. **J Vet Res**. 2019.
- NASCIMENTO, L. D. e S; NICOLAU R. A.; FILHO, A. L. M. M.: SANTOS J. Z. L. V.; V K. M. F.; FERREIRA. D. C. L.; SOUSA. R. C. DE; VIANA V. G. F. V.; CARVALHO. L. F. M.; SILVA. J. F. Effect of norbixin-based poly(hydroxybutyrate) membranes on

the tendon repair process after tenotomy in rats. **Acta Cir. Bras.** vol.34 no.11 São Paulo, nov. 2019. Epub Jan 13, 2020

NETO, C. de C. **Estudo histológico da tendinopatia induzida por injeções seriadas de colagenase: novo modelo experimental do tendão calcâneo de coelhos.** Tese de mestrado. Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. São Paulo, 2017.

NOGUEIRA, G.T. **Rotura de Tendão de Aquiles.** Tese de Mestrado Integrado em Medicina. Faculdade de Medicina de Lisboa. Portugal, Porto – 2017.

OLIVEIRA, L. P. **Efeito do tratamento tópico e por via oral com sinvastatina na cicatrização de ruptura do tendão de Aquiles.** Doutorado em Biologia Estrutural. Campinas- São Paulo, 2017.

OLIVEIRA, L. S.; SOBRAL, L. L.; TAKEDA, S. Y.; BETINI, J.; GUIRRO, R. R.; SOMAZZ, M. C.; TEODORI, R. M. Electrical stimulation and swimming in the acute phase of axonotmesis: their influence on nerve regeneration and functional recovery. **Revista de neurologia.**, v. 47, n. 1, p. 11-5, 2008.

OLIVEIRA, T. V. C. **Efeito tópico do óleo essencial da Apinia zerumbet no processo de reparo tecidual após lesão parcial do tendão calcâneo em ratos.** Tese de Doutorado da Universidade Tiradentes. RECIFE, Aracajú – 2017.

ORSI, P. R.; LANDIM-ALVARENGA, F. C.; JUSTULIN, L. A.; KANENO, R.; DE ASSIS GOLIM, M.; DOS SANTOS, D. C.; FERREIRA, R. SA unique heterologous fibrin sealant (HFS) as a candidate biological scaffold for mesenchymal stem cells in osteoporotic rats. **Stem cell research & therapy**, v. 8, n. 1, p. 205, 2017.

OZDENKAYA, Y.; et al. The effect of fibrin glue in preventing staple-line leak after sleeve gastrectomy. An experimental study in rats. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v. 34, n. 8, e201900801, 2019.

PARENTE, M. **Análise do efeito do LED (Light Emitting Diode) de 640nm no modelo experimental de tendinopatia traumática em ratos desnutridos.** Dissertação de mestrado, Universidade Nove de Julho, São Paulo, SP – 2013.

PERES, V. S. **Efeito do selante de fibrina derivado de peçonha de serpente associado a células-tronco mesenquimais na cicatrização de feridas cirúrgicas em ratos.** Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista. São Paulo, Botucatu – 2013.

PESSOA, D.R. Efeitos da terapia laser de baixa intensidade em modelo experimental de tendinopatia em ratos: Revisão de Literatura. **Revista Univap** v. 23, n. 43. São José dos Campos – SP – Brasil, dez. 2017.

PESTANA, P. R. D.; ALVES, A. N.; FERNANDES, K. P. S.; SILVA JUNIOR, J. A.; FRANÇA, C. R.; MARTINS, M. D.; et al. Efeito da natação na expressão de fatores regulatórios miogênicos durante o reparo do musculoesquelético de rato. **Rev Bras Med Esporte.** 2012.

PILLAI, D.S.; DHINSA, B.; KHAN, W. Tissue engineering in Achilles tendon reconstruction; the role of stem cells, growth factors and scaffolds. **Current stem cell research & therapy**, v. 12, n. 6, p. 506-512, 2017.

QIANMAN, B. *et. al.* Active exercise promotes Achilles tendon healing and is accompanied by the upregulation of collapsin response mediator protein-2 in rats. **Mol Med Reports**, v. 16, n. 3, p. 2355–2360, 2017.

QUINN, K.P.; GOLBERG, A.; BROELSCH, G. F.; KHAN, S.; VILLIGER, M.; BOUMA, B.; AUSTEN JR, W.G.; SHERIDAN, R.L.; MIHN JR, M. C.; YARMUSH, M.L.; GEORGAKOUDI, I. **An automated image processing method to quantify collagen fiber organization within cutaneous scar tissue**. Published in final edited form as: *Exp Dermatol*. 2015 January; 24(1): 78–80. doi:10.1111/exd.12553.

RADAK, Z.; TORMA, F.; BERKES, I.; GOTO, S.; MIMURA, T.; POSA, A.; KOLTAI, E. Exercise effects on physiological function during aging. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 132, p. 33-41, 2019.

RAHAL, S.C. *et. al.* Efeito da cola de fibrina derivada do veneno de serpente na viabilidade do enxerto autógeno de espessura parcial. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**, v. 10, n. 2, 2004.

RAJABI, A. H.; JAFFE, M.; ARINZEH, T. L. Piezoelectric materials for tissue regeneration: A review. **Acta Biomater**, v. 24, p. 12-23, Sep 2015.

RAJABI, H.; SHEIKHANI, H. S.; NOROUZIAN, M.; MEHRABANI, D.; NAZHVANI, S.D. Efeitos curativos das atividades aquáticas e injeção do plasma rico em plaquetas em plaquetas (PRP) nas lesões do tendão de aquiles em ratos experimentais. **World Journal Plast Surg**. 2015 Jan; 4(1): 66–73.

RIGGIN, CORINNE N.; SCHULTZ, S.M.; SEHGAL, M.S.; SOSLOWSKY, L.J. Ultrasound Evaluation of Anti-Vascular Endothelial Growth Factor–Induced Changes in Vascular Response Following Tendon Injury. **Ultrasound in medicine & biology**, v. 45, n. 7, p. 1841-1849, 2019.

ROSSO, F.; BONASIA, D. E.; MARMOTTI, A.; COTTINO, U.; ROSSI, R. Mechanical stimulation (pulsed electromagnetic fields “PEMF” and extracorporeal shock wave therapy “ESWT”) and tendon regeneration: a possible alternative. **Frontiers in aging neuroscience**, v. 7, p. 211, 2015.

RUOTI, R.G.; MORIS, D.M.; COLE, A.J. **Reabilitação aquática**. São Paulo: Manole, 2000.

SALTZMAN, B. M.; JAIN, A.; CAMPBELL, K. A.; MASCARENHAS, R.; ROMEO, A. A.; VERMA, N. N.; COLE, B. J. Does the use of platelet-rich plasma at the time of surgery improve clinical outcomes in arthroscopic rotator cuff repair when compared with control cohorts? A systematic review of meta-analyses. **Arthroscopy: The Journal of Arthroscopic & Related Surgery**, v. 32, n. 5, p. 906-918, 2016.

SANTANA, A.J. *et al.* Sericina e natação sobre parâmetros histomorfométricos de músculo plantar desnervado de ratos Wistar. **Einstein**, São Paulo, v. 16, n. 1, eAO4137, 2018.

SHEIKHANI-SHAHIN, H.; MEHRABANI, D.; ASHRAF, M. J.; RAJABI, H.; NOROUZIAN, M.; RAHMANIFAR, F.; ZARE, S. The healing effect of bone marrow-derived stem cells and aquatic activity in Achilles tendon injury. **Journal of the Hellenic Veterinary Medical Society**, v. 70, n. 1, p. 1373-1380, 2019.

SILVA, A.S.D.; LIMA, A.P. Os benefícios da reabilitação aquática para grupos especiais. **Lecturas Educación Física y Deportes**, Buenos Aires, v. 16, p. 159, 2011.

SILVA, F. O. C.; MACEDO, D. V. Exercício físico, processo inflamatório e adaptação: uma visão geral. **Rev. bras. cineantropom. Desempenho hum. (Online)**, Florianópolis, v. 13, n. 4, p. 320-328, Aug. 2011.

SOARES, J. P.; SILVA, A. I.; SILVA, A. M.; MATOS, M.; GAIVÃO, I.; MOTA, M. P. The effect of regular physical exercise in DNA damage and repair capacity: possible influence of the hOGG1 (Ser326Cys) polymorphism. **motricidade**, v. 15, p. 29-29, 2019.

SOLAKOGLU, C. et al. Fibrin sealant in the treatment of acute ruptures of the Achilles tendon: long-term results. **Eklem Hastalik Cerrahisi**, v. 21, n. 3, p. 124-129, 2010.

SOUZA, M. V. de et al. Histomorphometric analysis of the Achilles tendon of Wistar rats treated with laser therapy and eccentric exercise. **Pesq. Vet. Bras.**, Rio de Janeiro, v. 35, supl. 1, p. 39-50, Dec. 2015.

SOUZA, M. V. et al. Tendão de Aquiles de ratos wistar tratados com laserterapia e exercício excêntrico. **Rev Bras Med Esporte**, vol.21 no.5 São Paulo Sept./Oct. 2015.

STANKOVIĆ, B.; STANKOVIC, S.; VELJKOVIC, A. A.; STOJANOVIC, M. The Influence of Functional Abilities and Morphological Characteristics on Success in Apnea. **Journal of Athletic Performance and Nutrition**, v. 6, n. 1, p. 29-41, 2019.

SVENSSON, R. B.; HEINEMEIER, K. M.; COUPPÉ, C.; KJAER, M.; MAGNUSSON, S. P. Effect of aging and exercise on the tendon. **Journal of applied physiology**, v. 121, n. 6, p. 1353-1362, 2016.

TAKAMURA, M. et al. The effect of platelet-rich plasma on Achilles tendon healing in a rabbit model. **Acta Orthop Traumatol Turc**, v. 51, n. 1, p. 65-72, 2017.

TEMPFER, H.; KASER-EICHBERGER, A.; LEHNER, C.; GEHWOLF, R.; KORNTNER, S.; KUNKEL, N.; TRAWEGER, A. BEVACIZUMAB. improves Achilles tendon repair in a rat model. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 46, n. 3, p. 1148-1158, 2018.

VAN DER, D. M.; et al. Rerupture rate after early weightbearing in operative versus conservative treatment of Achilles tendon ruptures: a meta-analysis. **J. of Foot and Ankle Surgery**, v. 52. p. 622-628 i.5, sept – octo, 2013.

VASILADIS, A. V.; MARIS, A.; TSOUPLI, A.; SARIDIS, A. Rehabilitation exercise program after surgical treatment of quadriceps tendon rupture: A case report. **Physical Therapy in Sport**, v. 39, p. 82-89, 2019.

VIDIGAL DE CASTRO, M.; BARBIZAN, R.; SEABRA FERREIRA, R.; BARRAVIERA, B.; LEITE RODRIGUES DE OLIVEIRA. Direct spinal ventral root repair following avulsion: effectiveness of a new heterologous fibrin sealant on motoneuron survival and regeneration. **Neural plasticity**, v. 2016, 2016.

VIEIRA, C.P. et al. Glycine improves biochemical and biomechanical properties following inflammation of the achilles tendon. **Anat Rec**, v. 298, n. 3, p. 538-545, 2015.

VIEIRA, W. H. de B. **Efeitos do laser de baixa intensidade em 780 nm sobre a performance muscular aeróbica de ratos em treinamento físico em esteira**. Dissertação (Mestrado) Universidade Federal de São Carlo, 2005.

WALDEN, G., LIAO, X., DONELL, S., RAXWORTHY, M. J., RILEY, G. P.; SAEED, A. regeneration. **Tissue Engineering Part B: Reviews**, v. 23, n. 1, p. 44-58, 2017. WU, F.; NERLICH, M.; DOCHEVA, D. Tendon injuries. Basic science and Repais Proposals. **Efort Open Reviews**, v. 2, n. 7, 2017.

YOUNG, S.W.; PATEL, A.; ZHU, M. Weight-bearing in the nonoperative treatment of acute Achilles tendon ruptures: a randomized controlled trial. **J Bone Joint Surg Am**, v. 96, p. 1073-1079, 2014.

YU, M.S. et al. Aerosolized fibrin sealant is effective for postoperative edema and ecchymosis in open rhinoplasty without osteotomy. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 76, n. 9, 2000.e1–2000.e8, 2018.

YUKSEL, S. et al. Effect of plateletrich plasma for treatment of Achilles tendons in freemoving rats after surgical incision and treatment. **Acta Orthopaedica et Traumatologica Turcica**, v. 49, n. 5, p. 544-551, 2015.

ANEXO



GOVERNO DO ESTADO DO PIAUÍ
UNIVERSIDADE ESTADUAL DO PIAUÍ - UESPI
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS - CEUA



CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “EFEITO DO SELANTE DE FIBRINA DERIVADO DO VENENO DE SERPENTE ASSOCIADO À DIFERENTES TRATAMENTOS NO PROCESSO DE REPARO TENDINEO EM RATOS”. Protocolo número 0326/2019, sob responsabilidade de *Antonio Luiz Martins Maia Filho*, para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei número 11.794 de 08 de outubro de 2008, Decreto número 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi **DEFERIDO**, pela Comissão de Ética do Uso de Animais (CEUA/UESPI) da Universidade Estadual do Piauí.

ESPÉCIE	LINHAGEM	SEXO	IDADE	PESO	VIGÊNCIA DO PROJETO	Nº DE ANIMAIS
RATO ISOGÊNICO	WISTAR	MACHO+ FÊMEA	3-4 MESES	180 E 230G	01 ANO E MEIO	168

TERESINA, 15 DE ABRIL DE 2019


Dr. Francisco Araújo
 Sub-Coordenador CEUA/UESPI
 Portaria Nº 1347 - 20/11/14
 CRMV - 0415/17